CHARAKTERISIERUNG ZWEIER VERSCHIEDENER WIRKORTE VON ADENOSIN IM ADENYLATZYKLASE-SYSTEM DER RATTENFETTZELLE

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Thomas Trost
aus Heiligenstadt

1979

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 1979

Dekan: Prof. Dr. M. Hanack

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Schwabe

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

CHARAKTERISIERUNG ZWEIER VERSCHIEDENER WIRKORTE VON ADENOSIN IM ADENYLATZYKLASE-SYSTEM DER RATTENFETTZELLE

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Thomas Trost
aus Heiligenstadt

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Mai 1975 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. K. Stock am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover begonnen. Herr Professor Dr. K. Stock verstarb am 14. November 1978. Bis zur Fertigstellung der Arbeit im April 1979 übernahm Herr Professor Dr. U. Schwabe, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover, die weitere Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. K. Stock und Herrn Professor Dr. U. Schwabe für die Betreuung und ständige Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ferner danke ich allen Mitgliedern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, insbesondere den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Professor Dr. K. Stock, für zahlreiche Anregungen und gute Zusammenarbeit. Herrn Diplom-Chemiker Dr. F.E. Köster, Institut für Klinische Biochemie und Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover, danke ich für die Durchführung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548928_0012

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	Adenylatzyklase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ad	Adenosin
ADA	Adenosindesaminase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
atm	physikalische Atmosphäre
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-triphosphatase
Basal	Basalaktivität der Adenylatzyklase
C	Katalytische Untereinheit der Proteinkinase
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Ci	Curie
cm	Zentimeter
DC	Dünnschichtchromatographie
E.C.	Enzymnomenklatur entsprechend den Empfehlungen der IUPAC-IUB-Enzymkomission von 1972
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
EGTA	Äthylenglykol-bis(2-aminoäthyl)-tetraessigsäure
g	Gramm
x g	x Erdbeschleunigung
GMP-PNP	5'-Guanylylimidodiphosphat, Tetralithiumsalz
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography = Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IC_{25}	25 % -Hemmkonzentration (Mol/Liter)
IC_{50}	50 % -Hemmkonzentration (Mol/Liter)
K_d	scheinbare Dissoziationskonstante (Mol/Liter)
K_i	Inhibitorkonstante (Mol/Liter)
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer
l	Liter
M	molar (Mol/Liter)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

mM	millimolar (10^{-3}Mol/Liter)
mm	Millimeter
$\bar{M}_w$	mittleres Molekulargewicht
NaF	Natriumfluorid
nM	nanomolar (10^{-9}Mol/Liter)
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NOR	(-)-Noradrenalin
N.S.	nicht signifikant ($p > 0,05$)
P	anorganisches Phosphat
p	probability = Wahrscheinlichkeit
p.a.	pro analysi
PDE	Phosphodiesterase
PIA	N^6-Phenylisopropyladenosin
PK	Proteinkinase
pmol	Picomol
P_{rel}	relative Wirkungsstärke bezogen auf Adenosin
R	regulatorische Untereinheit der Proteinkinase
R_f	Retention factor
R_t	Retentionszeit (Minuten)
S.	signifikant ($p < 0,05$)
TCA	Trichloressigsäure
THEO	Theophyllin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit = Einheit
UV	ultraviolett
v/v	volume by volume = Volumen pro Volumen
w/v	weight by volume = Gewicht pro Volumen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar (10^{-6}Mol/Liter)

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG.....1

1.1. Das lipolytische System der Fettzelle.....1

1.2. Die Rolle des Adenosins im lipolytischen System der Fettzelle.....6

2. MATERIAL UND METHODEN.....13

2.1. Tiermaterial.....13

2.2. Biochemica und Chemikalien.....13

2.2.1. Dialyse von Adenosindesaminase.....15

2.2.2. Reinigung von Albumin.....15

2.2.3. Reinigung von Ficoll.....15

2.3. Spezielles Verbrauchsmaterial.....15

2.4. Lösungen.....16

2.4.1. Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (pH 7,4).....16

2.4.2. Szintillationslösung.....16

2.4.3. Lösung I (zur Plasmamembranpräparation).....16

2.4.4. Lösung II (zur Plasmamembranpräparation).....17

2.4.5. 25 %-Ficoll-Sucrose-Lösung zur Herstellung des Dichtegradienten.....17

2.4.6. 3 %-Ficoll-Sucrose-Lösung zur Herstellung des Dichtegradienten.....17

2.4.7. Lösung zur Dichtegradientenzentrifugation.....17

2.5. Geräte.....18

2.6. Präparation isolierter Fettzellen.....19

2.7. Bestimmung des zyklischen Adenosin-3',5'-monophosphats (cAMP).....20

2.8. Bestimmung von Glyzerin als Maß der Lipolyse...23

2.9. Präparation von Plasmamembranen der Rattenfettzelle.....25

2.10. Proteinbestimmung von Plasmamembranen.....27

2.11. Messung der Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle.....28

2.12. Dünnschichtchromatographische Untersuchung von 2'-Deoxyadenosin und 3'-Deoxyadenosin.....29

2.13. Untersuchung des Abbaus von N^6-Methyladenosin durch Adenosindesaminase.....30

Seite

2.13.1. Spektralphotometrie.....32

2.13.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....32

2.14. Statistik.....33

3. ERGEBNISSE.....34

3.1. Versuche mit isolierten Fettzellen.....34

3.1.1. N^6-substituierte Adenosinderivate.....35

3.1.1.1. Einfluß auf den durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt.....35

3.1.1.2. Einfluß auf die durch Noradrenalin stimulierte Lipolyse.....42

3.1.1.3. Einfluß auf die durch Theophyllin stimulierte Lipolyse.....50

3.1.1.4. Einfluß auf die durch Adenosindesaminase stimulierte Lipolyse.....54

3.1.1.5. Abbau von N^6-Methyladenosin durch Adenosindesaminase.....60

3.1.1.6. Einfluß auf die basale Lipolyse.....64

3.1.2. Verschiedenartig substituierte Adenosinderivate.....64

3.1.2.1. Einfluß auf den durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt.....66

3.1.2.2. Einfluß auf die durch Theophyllin stimulierte Lipolyse.....70

3.2. Versuche mit Plasmamembranen der Fettzelle.....74

3.2.1. N^6-substituierte Adenosinderivate und verschiedenartig substituierte Adenosinderivate....74

3.2.1.1. Einfluß auf die basale und die durch Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklase-aktivität.....75

3.2.1.2. Einfluß auf die basale und die durch Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität in Gegenwart von Adenosindesaminase.....83

3.2.1.3. Einfluß auf die basale und die durch Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität in Gegenwart von Adenosin.....86

3.2.1.4. Einfluß auf die durch 5'-Guanylylimidodiphosphat stimulierte Adenylatzyklaseaktivität...91

3.2.1.5. Einfluß auf die durch Natriumfluorid stimulierte Adenylatzyklaseaktivität.....97

3.3. Einfluß von Theophyllin auf die basale und die durch Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklase-aktivität von Plasmamembranen der Fettzelle und auf den durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen.....103

Seite

4. DISKUSSION.....116

5. ZUSAMMENFASSUNG.....137

5.1. Untersuchungen an isolierten Rattenfettzellen.....137

5.2. Untersuchungen an Plasmamembranen der Rattenfettzelle.....139

5.3. Schlußfolgerung.....140

6. LITERATURVERZEICHNIS.....141

1. EINLEITUNG

Das Fettgewebe spielt eine zentrale Rolle im Energiehaushalt des Organismus (Übersichten bei Brech and Gordon, 1967; Jeanrenaud, 1968). So kann die Fettzelle in Zeiten überschüssiger Nahrungsaufnahme energetisch hochwertige Fettsäuren in Form von Triglyceriden ("Neutralfette") speichern. Darüberhinaus verfügt die Fettzelle über ein regulatorisches System, das Fettsäuren durch Hydrolyse der Triglyceride freizusetzen vermag. Durch Oxidation dieser freien Fettsäuren können andere Organe, z.B. Herz oder Skelettmuskulatur, einen wesentlichen Teil ihres Energiebedarfs decken. Die Mobilisation von Fettsäuren aus dem Triglyceridpool der Fettzelle erscheint jedoch nur dann sinnvoll, wenn diese entsprechend den Bedürfnissen des Organismus (Hunger, Streß) gesteuert werden kann. So ist die Lipolyse, also die Freisetzung von Fettsäuren, neben der Lipogenese, dem Aufbau von Triglyceriden, die bedeutungsvollste biochemische Leistung der Fettzelle.

1.1. Das lipolytische System der Fettzelle

Die biochemischen Mechanismen, die zur Aktivierung der Lipolyse führen, sind in den letzten Jahren in zahlreichen Arbeiten erfolgreich untersucht worden (Übersichten bei Westermann, 1967; Robison et al., 1971; Butcher, 1971; Fain, 1973 b; Fain, 1977; Fain et al., 1978). Impulsgebend hierfür waren die Entdeckung des zyklischen Adenosin-3',5' -monophosphates (cAMP) im Jahre 1957 (Sutherland and Rall, 1957; Sutherland and Rall, 1958) und die Formulierung des "Second-messenger"-Konzeptes durch Sutherland und Mitarbeiter (Sutherland et al., 1965).

Abb.1 zeigt schematisch das Prinzip des "Second-messenger"-Systems. Ein Hormon (z.B. ACTH, Glucagon) oder Neurotransmitter (z.B. Noradrenalin, Dopamin) wird als "first messenger" reversibel an spezifische Rezeptoren der Zellaußenseite gebunden. Der so gebildete Hormon-Rezeptorkomplex aktiviert

daraufhin das an der Zellinnenwand befindliche Enzym Adenylatzyklase (AC) (ATP-pyrophosphatlyase; E.C. 4.6.1.1.).

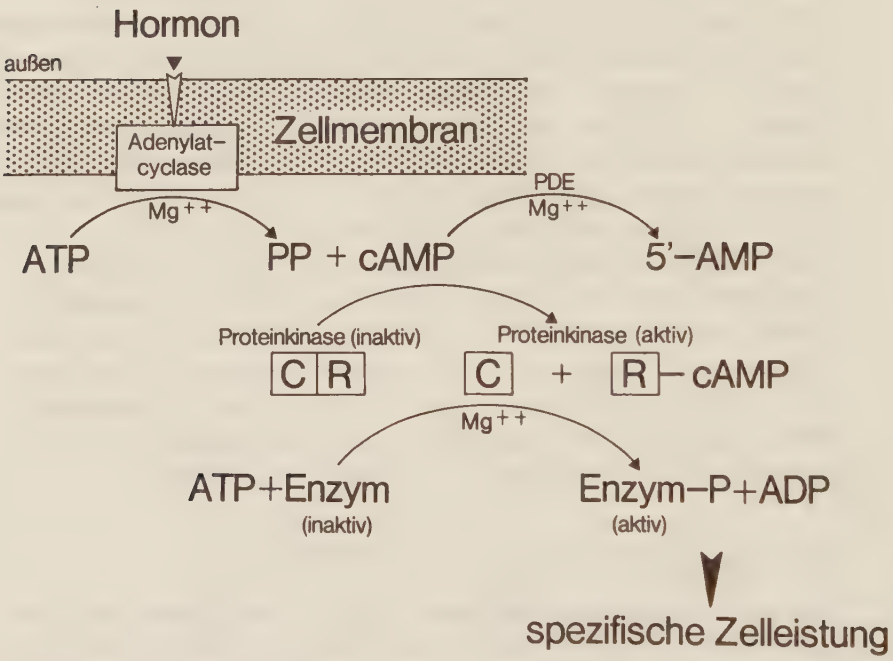


Abb.1: Schematische Darstellung des "Second-messenger"-Konzeptes zur intrazellulären Vermittlung von Hormonwirkungen (Nach Dinnendahl, 1976).

Über den genauen Mechanismus der Interaktion zwischen Hormon-Rezeptorkomplex und Adenylatzyklase bestehen jedoch noch weitgehend Unklarheiten (Übersichten bei Birnbaumer, 1973; Cuatrecasas, 1975; Helmreich, 1976; Kahn, 1976; Greaves, 1977).

Nach einer von Cuatrecasas (1974) entwickelten Hypothese sollen Rezeptoren und Adenylatzyklase völlig getrennte Strukturen darstellen, die in

der horizontalen Ebene der Plasmamembran relativ frei beweglich sind. In der Anwesenheit von Hormonen ist die Affinität zwischen Rezeptormolekül und Adenylatzyklasemolekül gering. Die Bindung eines Hormons am Rezeptor ändert jedoch die Eigenschaften des Rezeptormoleküls, erhöht spezifisch dessen Affinität zur Adenylatzyklase, so daß eine "Koppelung" zwischen Rezeptor und Adenylatzyklase möglich wird. Als Folge dieser Assoziation kommt es zu einer Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität.

Neben diesem hypothetischen Modell von Cuatrecasas sollen Guanylnukleotide und divalente Kationen (Mg^{2+} oder Mn^{2+}), die im zellfreien System (Zellhomogenat, Plasmamembranen) und unter bestimmten Versuchsbedingungen (z.B. pH; Temperatur) die Adenylatzyklaseaktivität stimulieren, eine wesentliche Rolle im Interaktionsprozeß zwischen Hormon-Rezeptorkomplex und Adenylatzyklase spielen (Rodbell, 1975; Yamamura, et al., 1977; Übersichten bei Rodbell et al., 1975; Londos and Rodbell, 1977).

Die Adenylatzyklase katalysiert die intramolekulare Veresterung von ATP zu cAMP unter Abspaltung von Pyrophosphat. Diese Reaktion erfordert die Anwesenheit von Mg^{2+}-Ionen, so daß ein Komplex aus ATP und Mg^{2+} das eigentliche Substrat der Adenylatzyklase darstellt (Birnbaumer et al., 1969; Übersicht bei Perkins, 1973). Das entstandene cAMP wirkt jedoch nicht unmittelbar auf das spezifische Enzym einer Zelle, sondern indirekt über die Aktivierung des Enzyms Proteinkinase (PK) (E.C. 2.7.1.37) (Übersichten bei Langan, 1973; Corbin et al., 1975; Swillens and Dumont, 1977). Die Proteinkinase besteht in ihrer inaktiven Form aus einer regulatorischen (R) und einer katalytischen (C) Untereinheit. Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit führt zu einer Dissoziation des Holoenzyms. Die nunmehr freie katalytische Untereinheit als aktive Form der Proteinkinase vermittelt die Phosphorylierung des spezifischen Zellenzyms durch ATP in der Gegenwart von Mg^{2+}. Diese Phosphorylierung bewirkt die Transformation des inaktiven Enzyms in seine aktive Form und führt damit zur Erhöhung der spezifischen Stoffwechselleistung einer Zelle als Folge der hormonellen Stimulation.

Der Abbau des cAMP zu 5'-Adenosinmonophosphat (5'-AMP) erfolgt

durch eine oder mehrere Phosphodiesterasen (PDE) (E.C. 3.1.4.17), deren Aktivität durch Mg^{2+}-Ionen als notwendiger Kofaktor reguliert wird (Klotz, 1972; Übersichten bei Appleman et al., 1973; Appleman and Terasaki, 1975). Die in einer Zelle aktive Konzentration an cAMP resultiert folglich aus dessen Bildungsrate durch die Adenylatzyklase und aus der Abbaurate des zyklischen Nukleotids durch die Phosphodiesterase.

Das hier schematisiert dargestellte "Second-messenger"-Konzept scheint ein allgemeingültiges Prinzip zu sein, um Wirkungen von Hormonen oder biologisch aktiven Substanzen intrazellulär zu vermitteln. So kennt man heute zahlreiche durch Hormone oder Neurotransmitter gesteuerte biologische Prozesse, die durch cAMP übertragen werden (Übersichten bei Robison et al., 1971; Daly, 1977). Die Spezifität bei diesen Übertragungsprozessen ist allein gegeben durch die Ausstattung einer Zelle mit bestimmten an die Adenylatzyklase "gekoppelten" Rezeptoren sowie durch das genetisch determinierte, zellspezifische Enzymmuster dieser Zelle, das einen bestimmten biologischen Prozeß katalysiert.

Im lipolytischen System der Fettzelle ist die "hormonsensitive" Triglyceridlipase das für die Spaltung von Neutralfetten geschwindigkeitsbestimmende Schlüsselenzym (Übersicht bei Steinberg, 1976). Die durch die PK aktivierte Triglyceridlipase katalysiert zunächst die Hydrolyse von Triglyceriden in Diglyceride und freie Fettsäuren. In zwei weiteren Folgereaktionen werden die entstandenen Diglyceride durch Diglyceridlipasen und Monoglyceridlipasen schließlich vollständig zu Glycerin und freien Fettsäuren abgebaut. Dabei ist noch unklar, ob die verschiedenen Lipaseaktivitäten durch ein oder mehrere Enzymproteine vermittelt werden. Das Glycerin gelangt durch Diffusion aus der Zelle, während die freien Fettsäuren durch einen Carrier-Mechanismus in den Extrazellulärraum transportiert werden (Übersicht bei Westermann, 1967).

An der Aktivierung der Lipolyse ist das sympathische Nervensystem wesentlich beteiligt, da dessen Fasern auch das Fettgewebe innervieren (Übersichten bei Havel, 1965; Brodie et al., 1965; Holzbauer and Sharman, 1972). Bei erhöhtem Sympathikustonus, z.B. in Streßsituationen, kommt es an den Endigungen der sympathischen Fasern zu einer vermehrten Freisetzung von Noradrenalin, das die Lipolyse durch Stimulation von $ß_1$-Rezeptoren (Übersicht bei Stock, 1975) aktiviert. Über denselben Rezeptor aktivieren auch andere Sympathikomimetika, wie z.B. Adrenalin oder Isoproterenol, das lipolytische System der Fettzelle. Erst kürzlich konnten Williams und Mitarbeiter (1976) den ß-adrenergen Rezeptor der Fettzelle durch Bindungsstudien weitgehend charakterisieren.

Neben den Katecholaminen stimulieren eine Reihe von unterschiedlichen Substanzen, wie z.B. Methylxanthine oder cAMP-Derivate, sowie zahlreiche Hormone die Lipolyse (Übersicht bei Robison et al., 1971).

Methylxanthine, wie z.B. das Theophyllin, hemmen die Aktivität der Phosphodiesterase (Übersichten bei Appleman et al., 1973; Chasin and Harris, 1976). So wurde bislang angenommen, daß der lipolytische Effekt der Methylxanthine im wesentlichen auf einer Hemmung des cAMP-Abbaus beruht (Beavo et al., 1970; Übersicht bei Robison et al., 1971). Hingegen sollen cAMP-Derivate, wie z.B. das N^6,2'-O-dibutyryl-cAMP, unter Umgehung der Adenylatzyklase eine direkte Aktivierung der Proteinkinase bewirken (Übersichten bei Simon et al., 1973; Miller, 1977).

Die meisten der lipolytisch wirksamen Hormone, wie z.B. Glucagon, ACTH oder Sekretin, scheinen - in ähnlicher Weise wie die Katecholamine - nach Assoziation an spezifische Rezeptoren auf der Zellaußenseite eine Aktivierung der Adenylatzyklase zu bewirken (Übersichten bei Birnbaumer, 1973; Frowein and Petersen, 1976). Die lipolytische Wirkung einiger Hormone beruht offenbar auf völlig anderen Wirkungsmechanismen. So soll z.B. das somatotrope Hormon, dessen lipolytischer Effekt erst nach 1-2 Stunden

einsetzt, in die Proteinsynthese der Fettzelle eingreifen und schließlich die Empfindlichkeit der Adenylatzyklase gegenüber Katecholaminen erhöhen (Übersicht bei Fain et al., 1978).

Substanzen unterschiedlichster Herkunft und chemischer Struktur, wie z.B. Beta-Sympatholytika, Insulin, Prostaglandine, Nicotinsäure oder Nukleoside, sind imstande, die Lipolyse zu hemmen (Übersichten bei Robison et al., 1971; Fain, 1973b). Unter den Nukleosiden scheint das Adenosin eine bedeutende Rolle als physiologischer Regulator der Lipolyse zu spielen.

1.2. Die Rolle des Adenosins im lipolytischen System der Fettzelle

Die antilipolytische Wirkung des Adenosins wurde erstmals von Dole (1961) beschrieben. 1961 fand er am isolierten epididymalen Fettgewebe der Ratte, daß der lipolytische Effekt des Adrenalins durch Adenosin und Adenosinderivate wie ATP, AMP und cAMP gehemmt wurde. Andere Autoren konnten die Befunde von Dole bestätigen und darüberhinaus zeigen, daß Adenosin auch die lipolytische Wirkung von Glucagon, ACTH oder Theophyllin inhibitorisch beeinflußte (Kappeler, 1966; Pereira and Holland, 1966; Raben and Matsuzaki, 1966; Blackard and Cameron, 1967; Davies, 1968). In diesen Untersuchungen am isolierten Fettgewebe oder an Fettgewebsstückchen waren jedoch Adenosin-Konzentrationen im Bereich von 0,01-1 mM erforderlich, um eine deutliche antilipolytische Wirkung zu erzielen. Angesichts solch hoher Konzentrationen schien Adenosin als physiologischer Regulator der Lipolyse keine Bedeutung zu haben (Schwabe et al., 1973).

Die relative Unwirksamkeit des Adenosins war jedoch durch die Art der verwendeten Präparation bedingt. Fettgewebe enthält neben Fettzellen noch andere Zelltypen, z.B. Bindegewebszellen oder Endothelzellen. Eine rasche Aufnahme oder der Abbau des Adenosins durch diese Zellen könnte den wahren lipolytischen Effekt des Nukleosids auf Fettzellen reduzieren (Ebert and Schwabe, 1973).

Tausendfach wirksamer erwies sich Adenosin an isolierten Fettzellen, einer homogenen Zellpräparation. Bei einer Adenosinkonzentration von 5 µM wurde bereits eine vollständige Hemmung der durch Theophyllin induzierten Lipolyse beobachtet. Gleiche Hemmstoffkonzentrationen konnten auch den lipolytischen Effekt des Noradrenalins reduzieren (Ebert and Schwabe, 1971).

Fain und Mitarbeiter (1972) konnten erstmals nachweisen, daß Adenosin den durch Noradrenalin hervorgerufenen cAMP-Anstieg isolierter Fettzellen unterdrückte. Ferner beobachteten dieselben Autoren eine inhibitorische Wirkung des Adenosins auf die Adenylatzyklaseaktivität von "ghosts", einer groben Plasmamembranpräparation, die durch hypotone Lyse von Fettzellen erhalten wird (Rodbell, 1967). So schien klar, daß die antilipolytische Wirkung des Adenosins ursächlich auf einer Hemmung der Adenylatzyklase beruhte.

cAMP-Anstieg und Lipolyse wurden durch Adenosin jedoch völlig unterschiedlich beeinflußt: Bei maximal wirksamen Noradrenalinkonzentrationen konnte Adenosin zwar den ausgeprägten cAMP-Anstieg scheinbar vollständig reduzieren, hatte aber offenbar keinerlei Wirkung auf die Lipolyse. Die Lipolyse sowie der geringe cAMP-Anstieg nach Theophyllin wurden hingegen durch Adenosin gleichermaßen gehemmt. Aus ihren Untersuchungen schlossen die Autoren (Fain et al., 1972), daß der weitaus größte Teil des cAMP-Anstiegs nach hormoneller Stimulation "überflüssig" sei und als "Exzeß"-cAMP an der Regulation der Lipolyse nicht teilnimmt. Adenosin könnte dabei möglicherweise die Rolle eines "feedback"-Regulators spielen, indem es durch Hemmung der aktivierten Adenylatzyklase eine "überflüssige" cAMP-Akkumulation vermeidet.

1973 entdeckten Schwabe und Mitarbeiter (Schwabe et al., 1973; Übersicht bei Schwabe et al., 1975), daß Fettzellen der Ratte ständig Adenosin bilden und an das Inkubationsmedium abgeben. In ihren Versuchen fanden sie, daß der Maximaleffekt eines lipolytischen Stimulators auf die Lipolyse und den cAMP-Spiegel

wesentlich von der Fettzellkonzentration im Inkubationsmedium abhing. So wurden z.B. nach Stimulation durch Noradrenalin bei einer Zellkonzentration von 20 000 Zellen/ml 10-fach höhere cAMP-Spiegel erhalten als bei einer Zellkonzentration von 100 000 Zellen/ml. Auf Grund der erhöhten Wirksamkeit lipolytischer Stimulatoren in verdünnten Zellsuspensionen vermuteten die Autoren, daß Fettzellen einen inhibitorischen Faktor freisetzen, den sie als Adenosin identifizieren konnten (Schwabe et al., 1973). Die Freisetzung des Adenosins erfolgte jedoch unabhängig von hormonellen Stimulatoren, so daß Adenosin nicht im Sinne eines "klassischen" feedback-Mechanismus an der Regulation des cAMP-Systems beteiligt zu sein scheint (Schwabe et al., 1973).

Die Freisetzung des Adenosins scheint für die Regulation der Lipolyse außerordentlich wichtig zu sein. Dies wird insbesondere in Versuchen mit Adenosindesaminase deutlich, einem Enzym, das die Umsetzung von Adenosin zu Inosin katalysiert. Das den Fettzellen zugesetzte Enzym bewirkt eine biologische Inaktivierung des freigesetzten Adenosins und führt so zu einem geringen, aber signifikanten Anstieg von cAMP und zu einer Lipolyse, wie sie sonst nur durch maximale hormonale Stimulation auslösbar ist (Fain, 1973a; Schwabe and Ebert, 1974; Fain and Wieser, 1975; Prilop, 1976). Adenosindesaminase potenziert die cAMP-steigernde Wirkung lipolytischer Stimulatoren und verzögert den raschen Abfall der cAMP-Spiegel, der sonst gewöhnlich nach hormoneller Stimulation eintritt. Hingegen konnte Adenosindesaminase die durch maximale Konzentrationen von Noradrenalin stimulierte Lipolyse nicht weiter steigern, d.h. der durch Inaktivierung von Adenosin zusätzlich hervorgerufene cAMP-Anstieg scheint "überflüssig" zu sein.

Adenosin, von der Fettzelle ständig freigesetzt, ist folglich ein absolut notwendiger physiologischer Regulator des lipolytischen Systems, der eine ständige "Drosselung" der Adenylatzyklase-Aktivität bewirkt und dadurch die basale Lipolyse kon-

trolliert. Diese "Drosselung" ist durch Hormonreize überwindbar, wobei Adenosin - in Bestätigung der oben aufgeführten Hypothese von Fain und Mitarbeiter (1972) - jedoch unökonomisch hohe cAMP-Spiegel unterdrückt.

Der Befund über die Freisetzung des Nukleosids aus Fettzellen ergab neue Aspekte zum Wirkungsmechanismus des Adenosins. Erste Hinweise auf einen extrazellulären "Adenosinrezeptor" stammen von Ebert und Schwabe (1973). Sie fanden, daß die antilipolytische Wirkung des Adenosins durch Dipyridamol nicht beeinflußt wurde, obwohl Dipyridamol eine starke Hemmung der Adenosinaufnahme in die Zelle bewirkte. Ähnliche Befunde wurden von Fain (1973a) erhoben: Adenosin hemmte den durch Noradrenalin hervorgerufenen cAMP-Anstieg gleichermaßen in Gegenwart oder Abwesenheit von Dipyridamol. Offenbar braucht Adenosin nicht in die Zelle zu gelangen, um seine inhibitorische Wirkung zu vermitteln. Ebenso sprachen die Befunde mit Adenosindesaminase dafür, daß Adenosin seinen inhibitorischen Effekt über einen Rezeptor auf der Zellaußenseite vermittelt (Schwabe and Ebert, 1974). Adenosindesaminase ist ein großes Proteinmolekül, dessen Eindringen in die Zelle für unwahrscheinlich gehalten wird. Die lipolytische Wirkung des Enzyms beruht folglich auf der Inaktivierung von extrazellulärem Adenosin.

Auffallend identisch erwiesen sich die Wirkungen von Adenosindesaminase und Theophyllin. Beide Substanzen bewirkten nur einen relativ geringen cAMP-Anstieg, konnten die Lipolyse jedoch maximal stimulieren und potenzierten den cAMP-Anstieg nach hormoneller Stimulation. Das ähnliche Wirkungsprofil beider Substanzen sowie neue Befunde, nach denen die lipolytische Wirkung der Methylxanthine keineswegs allein auf einer Hemmung der Phosphodiesterase zu beruhen scheint, führten zu der Hypothese, daß Theophyllin seinen lipolytischen Effekt durch einen Antagonismus der Adenosinwirkung an der Zellmembran vermittelt (Schwabe and Ebert, 1972; Ebert and Schwabe, 1973; Schwabe and Ebert, 1974). Der kompetitive Antagonismus zwischen Theophyllin und Adenosin, der auch in Gegenwart von Dipyridamol

gezeigt werden konnte, unterstützt diese Hypothese.

Die Wirkung des Adenosins scheint nicht erst nach einer Phosphorylierung oder Metabolisierung des Moleküls einzutreten. Unter verschiedenen Adenin-Nukleotiden wie ATP, ADP, 5'-AMP und Adenosinmetaboliten wie Inosin und Hypoxanthin war Adenosin der wirksamste Hemmstoff: Bereits 10 nM Adenosin konnten den durch Noradrenalin hervorgerufenen cAMP-Anstieg um mehr als 50 hemmen (Schwabe et al., 1973).

Der antilipolytische Effekt des Adenosins dürfte ausschließlich auf eine Hemmung der Adenylatzyklase zurückzuführen sein; andere Wirkunsgmechanismen konnten weitgehend ausgeschlossen werden. Möglich wäre z.B. eine Erhöhung der Phosphodiesterase-Aktivität oder eine Hemmung der Proteinkinase oder Lipase. Adenosin hemmt jedoch die Phosphodiesterase, wobei allerdings hohe Nukleosidkonzentrationen erforderlich sind (Fain et al., 1972). Die durch N^6,2'-O-dibutyryl-cAMP induzierte Lipolyse konnte selbst durch 1 mM Adenosin nicht gehemmt werden (Ebert and Schwabe, 1973).

Die inhibitorische Wirkung des Adenosins auf die Adenylatzyklaseaktivität im zellfreien System (Fain et al., 1972; McKenzie and Bär, 1973; Schwabe et al., 1975) scheint weiterhin für die Existenz eines membrangebundenen Adenosinrezeptors zu sprechen. Um einen signifikanten inhibitorischen Effekt im zellfreien System zu demonstrieren, waren allerdings 1000-fach höhere Adenosinkonzentrationen erforderlich als zur Hemmung des cAMP-Anstiegs in isolierten Zellen. Dieser Konzentrationsunterschied wurde jedoch auf die Tätigkeit der Adenosinkinase zurückgeführt, da Adenosin diesem Enzym lediglich im zellfreien System uneingeschränkt zur Verfügung steht (Schwabe et al., 1975).

Der antilipolytische Wirkungsmechanismus des Adenosins schien somit weitgehend geklärt zu sein. Adenosin wird analog wie Hormone oder Katecholamine über einen spezifischen Rezeptor

auf der Außenseite der Zellmembran wirksam und ruft dadurch eine Hemmung der Adenylatzyklase hervor.

Die einzigen Befunde, die sich nicht in dieses Schema einordnen ließen, wurden mit N^6-Phenylisopropyl-Adenosin (PIA), einem N^6-monosubstituierten Adenosinderivat, erhoben. Bereits 1969 hatten Westermann und Mitarbeiter (1969) die starke antilipolytische Wirkung des l-PIA in vivo und in vitro nachweisen können (Übersicht bei Westermann and Stock, 1970). An isolierten Fettzellen war l-PIA auf molarer Basis sogar stärker wirksam als Adenosin selbst. Dies konnte sowohl für den durch Noradrenalin ausgelösten cAMP-Anstieg (Fain, 1973a) als auch für die durch Theophyllin induzierte Lipolyse (Ebert and Schwabe, 1973) gezeigt werden. Ähnlich wie Adenosin bewirkte auch l-PIA eine Dissoziation zwischen Lipolyse und cAMP-Anstieg: Bei maximaler Stimulation durch Noradrenalin konnte l-PIA den cAMP-Anstieg nahezu vollständig hemmen, während die Lipolyse unbeeinflußt blieb (Stock and Prilop, 1974). Trotz struktureller Gemeinsamkeiten und ähnlichem Wirkungsprofil an isolierten Zellen erwies sich PIA im zellfreien System als völlig unwirksam: Im Gegensatz zu Adenosin konnten selbst hohe Konzentrationen von l-PIA die Adenylatzyklase-Aktivität von Fettzell-"ghosts" nicht hemmen (Fain et al., 1972).

Der Wirkungsverlust des l-PIA im zellfreien System wirft folgende Fragen auf:

1. In welchem Maße verändert sich das Wirkungsprofil des Adenosins, wenn systematisch unterschiedliche Substituenten (z.B. Methyl-, n-Propyl, usw.) in die N^6-Position des Moleküls eingeführt werden?

2. Haben N^6-substituierte Adenosinderivate einen von Adenosin verschiedenen Wirkungsmechanismus?

3. Besteht zwischen der inhibitorischen Wirkung des Adenosins auf die Adenylatzyklase im zellfreien

System und dessen antilipolytischem Effekt an intakten Zellen tatsächlich ein kausaler Zusammenhang?

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine vergleichende systematische Untersuchung der Wirkungen von Adenosin, N^6-substituierten Adenosinderivaten und verschiedenartig substituierten Adenosinderivaten auf den cAMP-Gehalt und die Lipolyse isolierter Fettzellen sowie auf die Adenylatzyklase-Aktivität von Plasmamenbranen der Fettzelle.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiermaterial

Verwendet wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Firma Wiga, 8741 Sulzfeld) mit einem Gewicht von 160-220 g. Die Tiere wurden in konstant temperierten Räumen (22 ± 2°C) und unter kontrollierten Lichtverhältnissen (12 Std.-Licht-Dunkelrhythmus) in Makrolonkäfigen gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und standardisiertem Trockenfutter (Fa. Hope-Farms, Woerden/Holland). Frühestens 3-4 Tage nach der Anlieferung wurden die Tiere zu Versuchszwecken verwendet.

2.2. Biochemica und Chemikalien

Adenosin-Desaminase aus Kälberdarm (200 U/mg; Suspension in Ammoniumsulfat-Lsg. 3,2 mol/l), Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim;

^{3}H(G)-Adenosin-3',5'-monophosphat, cyclisch, Ammoniumsalz (30-50 Ci/mmol), NEN Chemicals GmbH, 6072 Dreieich;

Adenosin-3',5'-monophosphorsäure, cyclisch (cAMP), Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim;

Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim;

Albumin aus Rinderserum, Cohn-Fraktion V, Serva, Heidelberg;

Collagenase (138 U/mg), Worthington Biochem. Corp., Freehold, New Jersey, U.S.A.;

Creatin-Kinase aus Kaninchenmuskel (25 U/mg Lyophilisat), Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim;

Creatinphosphat, Dinatriumsalz, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim;

Ficoll 400, Pharmacia Fine Chemicals, AB, Uppsala, Schweden;

Guanylyl-imidodiphosphat, Tetralithiumsalz, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim;

Natriumfluorid, Merck, Darmstadt;

(-)-Noradrenalin-HCl, Merck-Schuchardt, München;

Theophyllin, Merck, Darmstadt;

Nukleoside:
Adenosin, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim;

1, N^6-Ethenoadenosin, Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.;

Inosin, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim;

N^6-monosubstituierte Adenosinderivate (s. Abb.2) wurden freundlicherweise von der Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, zur Verfügung gestellt.

Folgende Derivate wurden freundlicherweise von Dr. S. Boos, Arbeitsgruppe Biochemie, Fachbereich Naturwissenschaften der Universität Paderborn, zur Verfügung gestellt:

Cordycepin (= 3'-Deoxyadenosin), Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.;

8,2'-O-Cyclo-Adenosin, Dr. M. Ikehara, Universität Osaka, Dept. Pharm. Sci., Osaka/Japan;

2'-Deoxyadenosin, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim;

Folgende Derivate wurden freundlicherweise von Dr. J. Daly, National Institutes of Health, Bethesda, Md., U.S.A., zur Verfügung gestellt:

2'-Deoxyadenosin, Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.;

2',5'-Dideoxyadenosin, Cancer Chemotherapy Natl. Service Center, National Cancer Institute, Bethesda, Md., U.S.A.;

2'-Fluoroadenosin, Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.;

3'-O-Methyladenosin, Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.;

Tubercidin (7-Deazaadenosin), Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.;

Alle Nukleoside wurden in Quarz-bidestilliertem Wasser gelöst.

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Fa. Merck,

Darmstadt, bezogen und waren, soweit erhältlich, von analytischem Reinheitsgrad ("p.a.").

2.2.1. Dialyse von Adenosindesaminase

Adenosindesaminase wurde 1:10 mit Wasser verdünnt und über Nacht im Kühlraum (+ 4°C) gegen ein 100faches Volumen Wasser dialysiert, um den hohen Gehalt an Ammoniumsulfat zu reduzieren.

2.2.2. Reinigung von Albumin

Albumin wurde nach Chen (1967) mit Aktivkohle behandelt, um Verunreinigungen durch Glyzerin und freie Fettsäuren zu entfernen. Dazu wurden 100 g Albumin in 1000 ml Wasser bei Zimmertemperatur gelöst. Anschließend wurde 50 g Aktivkohle zugegeben. Die Suspension wurde mit 0,2 N HCl auf pH 3,0 eingestellt und 1 Stunde im Eisbad gerührt. Danach wurde die Kohle durch Zentrifugation (MSE Mistral 6 L) bei 2100 x g und anschließende Überdruckfiltration entfernt. Die Albuminlösung wurde mit 0,2 N NaOH auf pH 7,0 gebracht und in flüssigem N_2 eingefroren. Das Lösungsmittel wurde durch Gefriertrocknung entfernt.

2.2.3. Reinigung von Ficoll

250 g Ficoll (Kopolymerisat aus Sucrose und Epichlorhydrin; $\overline{M}_w$ = 400 000) wurden in 1000 ml H_2O gelöst. Die 25 %ige (w/v) Ficoll-Lösung wurde in Dialysierschläuche abgefüllt und 24 Std. bei + 4°C gegen ein Volumen von 10 l H_2O dialysiert. Das Ficoll wurde anschließend durch Gefriertrocknung lyophilisiert.

2.3. Spezielles Verbrauchsmaterial

Filter aus Zelluloseester BA 85	Schleicher u. Schüll, 3354 Dassel
Visking-Dialysierschlauch	Serva, Heidelberg

Zählgefäße aus Kunstoff zur Szintillationsspektrometrie, Ausführung A-II — 3 H Kunstofftechnik, Heidelberg

2.4. Lösungen

2.4.1. Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (pH 7,4)

Verwendet wurde der von Rodbell (1964) zur Isolation und Inkubation von Fettzellen angegebene Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer. Der Puffer war folgendermaßen zusammengesetzt:

NaCl	(0,154 M)	100,0 ml
KCl	(0,154 M)	4,0 ml
$CaCl_2 x2H_2O$	(0,110 M)	1,5 ml
$MgSO_4x7H_2O$	(0,154 M)	1,0 ml
$KH_2\ PO_4$	(0,154 M)	1,0 ml
$NaHCO_3$	(0,154 M, 60 min mit CO_2 begast)	21,0 ml

Der Puffer wurde vor Versuchsbeginn aus den einzelnen Lösungen frisch hergestellt, 10 min mit Carbogen (95 % O_2/5 % CO_2) begast und nach Zugabe von Albumin (Endkonzentration 1 % bzw. 2 %) mit 0,1 N KOH (glyzerinfrei!) oder 0,1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt.

2.4.2. Szintillationslösung

POP (2,5 - Diphenyloxazol)	40,0 g
POPOP (2,2'-p-Phenylen bis(5-phenyloxazol))	1,0 g
2-Äthoxyäthanol (Cellosolve)	1000,0 ml
Toluol	9000,0 ml

2.4.3. Lösung I (zur Plasmamembranpräparation)

Saccharose	0,25 M
EDTA (Titriplex III)	1 mM
Tris	10 mM

mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt.

2.4.4. Lösung II (zur Plasmamembranpräparation)

Saccharose	0,25 M
EGTA (Titriplex VI)	1 mM
Tris	10 mM

mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt.

2.4.5. 25%-Ficoll-Sucrose-Lösung zur Herstellung des Dichtegradienten

75,0 g gereinigtes Ficoll wurden in 300 ml Lösung I gelöst. Es resultiert eine 25 %ige (w/v) Lösung.

2.4.6. 3%-Ficoll-Sucrose-Lösung zur Herstellung des Dichtegradienten

3,0 ml 25%-Ficoll-Sucrose-Lösung wurden mit 22,0 ml Lösung I verdünnt, um eine 3%ige Ficoll-Sucrose-Lösung zu erhalten.

2.4.7. Lösung zur Dichtegradientenzentrifugation

Der Gradient wurde mit Hilfe eines Zwei-Kammer-Dichtegradientenmischers aufgebaut.

> Dieser besteht aus einem Plexiglasblock (65 mm breit; 95 mm hoch; 25 mm tief), mit zwei Bohrungen (Durchmesser 15 mm, Tiefe 80 mm), die die beiden Kammern darstellen. Vordere und hintere Kammer sind auf Bodenebene durch eine mittenbefindliche, waagerechte Bohrung (Durchmesser 1 mm) miteinander verbunden. Diese Bohrung ist mittels eines Nadelventils von außen verschließbar. Die Nadel wird dabei von der schmalen Seite des Blockes durch die hintere Kammer zur Kammerverbindung geführt und ist durch ein Gewinde verstellbar. Die vordere Kammer besitzt in Fortführung der Verbindungsöffnung zwischen beiden Kammern einen Auslaufstutzen, an dem sich ein Silikonschlauch befindet, der an die Wand des sich in Schräglage befindlichen Zentrifugenröhrchens gebracht wird, um ein möglichst verwirbelungsfreies Auslaufen der Lösung zu gewährleisten.

Die Kammerverbindung wurde verschlossen. In die vordere Kammer wurde ein Magnetrührer gegeben. Die vordere Kammer wurde mit 7,0 ml 25%-Ficoll-Sucrose-Lösung beschickt; die hintere Kammer wurde mit 8,0 ml 3%-Ficoll-Sucrose-Lösung beschickt. Das Ventil wurde geöffnet. Unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in der

Kälte (+ 4°C) lief die Gradientenmischung in ein Zentrifugenröhrchen.

Auf diese Weise entsteht ein linearer Dichtegradient mit einer Dichte von 1,05 - 1,25. In diesem Gradienten verteilen sich die subzellulären Partikel entsprechend ihrer eigenen Dichte unterschiedlich, so daß die Plasmamembran im ersten Drittel des Gradienten bei einer Dichte von ungefähr 1,14 gefunden wurden. In dieser Dichtezone bildeten sie eine grau-weiße Bande.

2.5. Geräte

Beckman Spectrophotometer DB-T; Beckman Instruments, München

Christ-Zentrifuge Typ UJ 3 SW; Heraeus Christ, 3360 Osterode

Colora-Zell-Homogenisator; Colora Messtechnik GmbH, 7073 Lorch

Eppendorf Photometer 1101 M; Eppendorf-Gerätebau, Hamburg
Eppendorf Rotationsmischer 3300; " " "
Eppendorf Thermostat 3401; " " "
Eppendorf Tischzentrifuge 3200; " " "

Flüssigkeits-Szintillations-Zähler Nuclear Chicago Mark II; G.P. Searle GmbH, Nuclear Chicago Division, 6056 Heusenstamm

Gefriertrocknungsanlage Virtis, Modell-Nr. 10-146 MR-BA; Virtis Gardiner, New York/U.S.A., c./o. Cenco Deutschland, 5657 Haan

Magnetrührer Typ RCH; Janke u. Künkel KG, Staufen i. Breisgau

MSE Mistral 6 L Zentrifuge;
MSE Superspeed 65 Ultrazentrifuge; Measuring and Scientific Equipment Ltd., Crawley, Sussex/England, c./o. Colora-Messtechnik GmbH, 7073 Lorch

Schüttelwasserbad GFL Typ 1083; Gesellschaft für Labortechnik mbH + Co., Großburgwedel bei Hannover

Servogor Kompensationsschreiber RE 511; Metrawatt AG, Nürnberg

Sorvall Superspeed RC 2-B Zentrifuge; I. Sorvall Inc., Newton, Connecticut/U.S.A., c./o. DU PONT DE NEMOURS, 635 Bad Nauheim 1

Spectra Physics Rechner-Integrator Autolab System I; Spectra Physics, Darmstadt

Zeiss Stereomikroskop; Carl Zeiss, Oberkochen
Zeiss PM 4 UV-Photometer; " "

2.6. Präparation isolierter Fettzellen

Die Isolierung von Fettzellen erfolgte weitgehend nach der Methode von Rodbell (1964). Dabei wird das Fettgewebe mit Kollagenase inkubiert, um die interzellulären Kollagenbrücken zu lösen. Die isolierten Fettzellen können nach Abfiltration des interstitiellen Bindegewebes durch Zentrifugation vom Inkubationsmedium getrennt werden.

Beschreibung: 1-2 Ratten wurden durch Dekapitation getötet und entblutet. Den Tieren wurde das Nebenhodenfettgewebe (ca. 1,0 g) entnommen. Das Gewebe wurde mit einer Schere zerkleinert und in 10 ml Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer (KRB), pH 7,4, mit 100 mg Albumin, 5 mg Glucose und 10 mg Kollagenase 45 min lang in einem Schüttelwasserbad (Schüttelfrequenz 120/min) bei 37°C inkubiert; die Gasphase über der Inkubationslösung bestand aus 95 % O_2/5 % CO_2. Anschließend wurden die Fettzellen mittels eines Nylonnetzes (Maschendurchmesser 0,3 mm) vom interstitiellen Bindegewebe getrennt, wobei portionsweise mit insgesamt 15 ml KRB-Albumin 1 %-Puffer nachgespült wurde. Alle Puffer zum Waschen, Nachspülen usw. wurden auf 37°C gehalten und hatten einen pH-Wert von 7,4.

Das Filtrat wurde 6 min bei 145 x g (Christ-Zentrifuge) zentrifugiert, der Unterstand anschließend abgesaugt. Die Zellen wurden in 15 ml KRB-Albumin-1%-Puffer resuspendiert und 2 min bei 145 x g (Christ-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Unterstand wurde wieder abgesaugt, die Zellsuspension erneut in 15 ml KRB-Albumin-1%-Puffer aufgenommen und 2 min bei 145 x g (Christ-Zentrifuge) zentrifugiert. Nach Absaugen des Unterstandes wurden die Zellen in 60 ml KRB-Albumin-1%-Puffer resuspendiert, kurz mit Carbogen begast und in einem Wasserbad bei 37°C mittels eines Magnetrührers in Suspension gehalten.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 0,2 ml dieser Suspension mit KRB-Albumin-1%-Puffer 1:5 (v/v) verdünnt. 10 µl dieser

Verdünnung wurden als hängender Tropfen unter ein Stereomikroskop (Zeiss) gebracht, um die Zellen bei 50facher Vergrößerung vollständig zu zählen.

Nach der Zählung wurde die Fettzellsuspension 2 min bei 145 x g (Christ-Zentrifuge) zentrifugiert. Nach Absaugen des Unterstandes wurden die Fettzellen mit KRB-Albumin-2%-Puffer so verdünnt, daß eine Konzentration von 35000 ± 5000 Zellen/ml erhalten wurde. Die Fettzellsuspension wurde in ein Wasserbad von 37°C gebracht, mit einem Magnetrührer intensiv gemischt und kurz mit Carbogen begast. Jeweils 1,0 ml der ständig gerührten Zellsuspension wurde möglichst rasch in die Inkubationsgefäße (Zählgefäße zur Szintillationsspektrometrie) pipettiert, die in einem Schüttelwasserbad auf 37°C vorgewärmt worden waren und bereits die zu testenden Substanzen enthielten. Das Endvolumen der Inkubate betrug 1,1 ml. Die Gefäße wurden bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 120/min verschieden lange inkubiert. Die Gefäße für die Glyzerinbestimmung (60 min) wurden zusätzlich mit Carbogen begast und fest verschlossen. Die exakte Zellzahl der zur Inkubation verwendeten Zellsuspension wurde analog der oben aufgeführten Methode bestimmt. Sie betrug in allen Versuchen 35000 ± 5000 Zellen/ml.

Jegliches Material (Bechergläser, Pipetten usw.), das mit den Fettzellen unmittelbaren Kontakt hatte, war aus Kunststoff, um eine Schädigung (Platzen) der Fettzellen nach Berührung mit Glas zu vermeiden.

2.7. Bestimmung des zyklischen Adenosin-3',5'-monophosphats (cAMP)

Die Bestimmung von cAMP erfolgte nach der Methode von Gilman (1970). Sie beruht auf der Kompetition von cAMP mit einer vorgegebenen Menge ^{3}H-cAMP um die Bindung an die regulatorische Untereinheit einer cAMP-abhängigen Proteinkinase aus Rindermuskulatur. Der cAMP-Proteinkomplex wird auf einem Zelluloseesterfilter adsorbiert. Nach Auflösen des Filters

wird die Radioaktivität des cAMP-Proteinkomplexes im Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen. Mittels einer linearisierten Eichkurve wird der cAMP-Gehalt der Untersuchungsproben berechnet.

Beschreibung: Die Fettzellinkubation wurde zur Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen nach 5 min, zur Untersuchung der Zeit-Wirkungsbeziehungen nach den in den Abbildungen angegebenen Zeiten mit 1,0 ml 10%-Trichloressigsäure (TCA) beendet. In jedem Versuch wurden zwei Wiederauffindungen (1,0 ml Fettzellsuspension + 1,0 ml 10%-TCA + 100 µl einer 10^{-6}M cAMP-Lösung = 100 pmol cAMP in H_2O als Lösungsmittel) und zwei Leerwerte (1,0 ml KRB-Albumin 2%-Lösung + 1,0 ml 10% TCA + 100 µl H_2O) mitbestimmt. Die Proben wurden 12 min bei 1100 x g (Christ-Zentrifuge) zentrifugiert; der Überstand wurde in Eppendorf-Reagiergefäße dekantiert und 2 min bei 8000 x g (Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert. Danach wurde die oberständige Fettschicht vorsichtig abgesaugt. 200 µl des Überstandes wurden abgenommen und nach Zugabe von 20 µl 1 N HCl dreimal mit jeweils 1,0 ml H_2O-gesättigtem Diäthyläther ausgeschüttelt, um die TCA zu entfernen. Die Ätherreste wurden während 10 min bei 56°C abgedampft. Die Proben wurden im Alkoholbad bei -37°C tiefgefroren und über Nacht gefriergetrocknet.

Nach diesem Extraktionsverfahren folgte die cAMP-Bestimmung nach Gilman (1970). Die lyophylisierten Proben wurden in 200 µl Na-Acetatpuffer (50 mM; pH 4,0) aufgenommen und auf einem Rotationsmischer gelöst. Der Proteinbindungs-Test erfolgte als Doppelbestimmung und wurde in eisgekühlten Eppendorf-Reagiergefäßen durchgeführt.

Ein Ansatz enthielt 50 µl Probe, 50 µl Na-Acetatpuffer (50 mM; pH 4,0), 50 µl einer 10^{-8}M ^{3}H-cAMP-Lösung (= 0,5 pmol ^{3}H-cAMP in Na-Acetatpuffer (50 mM; pH 4,0) als Lösungsmittel) und 50 µl eiskaltes Bindungsprotein in 0,1 %iger Albuminlösung.

Das im hiesigen Institut nach Miyamoto und Mitarbeitern (1969) in einer Modifikation von Gilman (1970; Übersicht 1972) hergestellte Bindungsprotein aus Rindermuskel war zuvor mit der 0,1 %igen Albuminlösung so verdünnt worden, daß in einem Testvolumen von 200 µl und bei Verwendung von 0,5 pmol ^{3}H-cAMP eine 20 - 25 %ige Bindung erhalten wurde.

Für jede Inkubationsserie wurde eine Eichreihe mitbestimmt. Diese enthielt neben dem Bindungsprotein und 0,5 pmol ^{3}H-cAMP bekannte Mengen cAMP (0,2 - 10,0 pmol) in jeweils 50 µl Na-Acetatpuffer (50 mM; pH 4,0) sowie jeweils 50 µl Leerwertprobe, um in der Eichreihe gleiche Bedingungen (Salzkonzentrationen usw.) einzuhalten wie bei den Testproben. Die Ansätze wurden 150 min im Eisbad inkubiert, so daß eine Äquilibrierung der Bindung erreicht wurde.

Die Filtration erfolgte mittels Zelluloseesterfilter, die in einem eisgekühlten Filtrierblock (Kapazität: 24 Einzelfiltrationen) eingelegt und mit einigen ml eiskaltem K-Phosphatpuffer (20 mM; pH 6,0) angefeuchtet worden waren. Die zu filtrierenden Bindungsansätze wurden mit 0,5 ml eiskaltem K-Phosphatpuffer (20 mM, pH 6,0) verdünnt; das Gesamtvolumen eines Ansatzes wurde anschließend auf ein Filter gegeben. Die Filtration erfolgte mittels Unterdruck, der mit einer Wasserstrahlpumpe erzeugt wurde. Während der Filtration wurde mit 2 ml K-Phosphatpuffer (20 mM; pH 6,0) nachgespült. Die Filter wurden in Zählgefäßen mit jeweils 1,0 ml Äthoxyäthanol (Cellosolve) aufgelöst. Für jede Inkubationsserie wurden zwei Filtrationsleerwerte [0,5 pmol ^{3}H-cAMP in 50 µl Na-Acetatpuffer (50 mM; pH 4,0) + 50 µl Leerwertprobe + 50 µl Na-Acetatpuffer (50 mM; pH 4,0) + 50 µl 0,1 %ige Albuminlösung + 0,5 ml K-Phosphatpuffer (20 mM; pH 6,0)] und zwei ^{3}H-cAMP-Standardwerte [0,5 pmol ^{3}H-cAMP in 50 µl Na-Acetatpuffer (50 mM; pH 4,0) + ein mit K-Phosphatpuffer (20 mM; pH 6,0) angefeuchtetes Filter; beides direkt in ein Zählgefäß mit 1,0 ml Äthoxyäthanol gegeben] mitbestimmt. Nach Auflösen des Filters wurden jeweils 5,0 ml Szintillationslösung in die Zählgefäße

gegeben und mit dem Inhalt intensiv vermischt. Die Radioaktivität wurde 4 min lang im Szintillationsspektrometer gemessen.

Die Berechnung der cAMP-Werte erfolgte auf einer Datenendstation mit Hilfe eines Programmes für doppelt-logarithmische Regressionen durch den Großrechner der Medizinischen Hochschule Hannover. Dabei wurden die Eichmeßwerte aus dem Szintillationsspektrometer (Impulse/min) eingegeben, der Filtrationsleerwert jeweils subtrahiert und die Differenzen doppelt-logarithmisch transformiert, um daraus eine lineare Regressionsgerade zu berechnen. Die eingegebenen Meßwerte wurden an der Regressionsgeraden (= Eichgerade) abgegriffen, um so den cAMP-Gehalt unter Berücksichtigung der Zellkonzentration in pmol cAMP/10^5 Zellen zu ermitteln. Die Inkubationsleerwerte wurden subtrahiert, der cAMP-Gehalt entsprechend der Wiederauffindung korrigiert.

Keiner der verwendeten Inhibitoren oder Stimulatoren interferierte mit der cAMP-Bestimmungsmethode.

2.8. Bestimmung von Glyzerin als Maß der Lipolyse

Glyzerin wurde entsprechend den Angaben von Lambert und Neish (1950) unter Verwendung der Formaldehyd-Bestimungsmethode von Nash (1953) bestimmt. Dabei wird 1 Mol Glyzerin mit Natriumperjodat zu 2 Mol Ameisensäure und 1 Mol Formaldehyd oxidiert. Überschüssiges Natriumperjodat wird mit Natriumarsenit zu Jodid reduziert. Formaldehyd reagiert mit Acetylaceton und Ammoniumionen in neutraler Lösung analog der Hantzschen Dihydropyridinsynthese zu Diacetyldihydrolutidin, das die Lösung gelb färbt. Die Extinktion der Lösung, gemessen bei 405 nm, ist proportional der Menge an Formaldehyd, die der Menge an Glyzerin entspricht.

Beschreibung: Die Fettzellinkubationen wurden zur Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen nach 60 min, zur Untersuchung der Zeit-Wirkungsbeziehungen nach den in den Abbildungen angegebenen Zeiten mit 1,0 ml 10 %-Trichloressigsäure

(TCA) beendet. Die Inkubate wurden 12 min bei 1100 x g (Christ-Zentrifuge) zentrifugiert; der Überstand wurde in Eppendorf-Reagiergefäße dekantiert und 2 min bei 8000 x g (Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert. Die oberständige Fettschicht wurde abgesaugt. Jeweils 500 µl der klaren Lösung wurden zur Glyzerinbestimmung verwendet, die in Doppelansätzen durchgeführt wurde. Einer Probe von 500 µl wurden 50 µl Natriummetaperjodat-Lösung (0,05 M) zugesetzt. Nach intensivem Mischen (Rotationsmischer) wurde die Probe 5 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach wurden 50 µl Natriummetaarsenit-Lösung (2,0 M) zugesetzt. Nach intensivem Mischen wurde die Probe 10 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. Der Probe wurden anschließend 500 µl Acetylaceton-Reagenz (0,1 ml Acetylaceton in 50,0 ml einer 2 M Ammoniumacetat-Lösung; jedesmal frisch zubereitet) zugesetzt. Nach intensivem Mischen wurde die Probe 10 min lang bei 56°C inkubiert. Die Probe wurde auf Zimmertemperatur abgekühlt. Die Extinktion der Probe wurde bei 405 nm im Photometer (Eppendorf) gemessen.

Bei jedem Versuch wurden 1 Leerwert (100 µl H_2O) und 3 Eichstandardwerte (50; 100 bzw. 150 nmol Glyzerin/100 µl H_2O) mitbestimmt. Der Leerwert und die Standardwerte wurden wie die übrigen Inkubate behandelt und enthielten ausschließlich der Fettzellen das Inkubationsmedium (1,0 ml KRB-Albumin 2 %-Puffer) und die TCA (1,0 ml einer 10 %igen Lösung).

Die Berechnung der von den Fettzellen gebildeten Glyzerinmenge erfolgte unter Verwendung der Glyzerineichstandardreihe sowie des Leerwertes nach folgender Gleichung:

$$\text{Glyzerin nmol/Probe} = EP - EL \times \frac{300}{(EE-3EL)}$$

wobei gilt:

EP: Extinktion der Probe

EL: Extinktion der Leerwerte

EE: Summe der Extinktionen der Eichstandardwerte (50; 100; 150 nmol Glyzerin)

Unter Berücksichtigung der jeweiligen Zellkonzentrationen wurden die Werte in nmol Glyzerin/10^5 Zellen x 60 min (bei Zeitkurven in nmol Glyzerin/10^5 Zellen) angegeben.

2'-Deoxyadenosin (Fa. Boehringer wie auch Fa. Sigma) war die einzige Substanz, die mit der Glyzerinbestimmungsmethode interferierte. Unter Einwirkung der Reagenzien fand sich bei zunehmenden Konzentrationen dieses Derivats eine zunehmende Gelbfärbung des Reaktionsmediums. Bei den Versuchen mit 2'-Deoxyadenosin wurden daher Leerwerte mit den verwendeten Derivatkonzentrationen von den entsprechenden Probenwerten subtrahiert.

2.9. Präparation von Plasmamembranen der Rattenfettzelle

Plasmamembranen isolierter Rattenfettzellen wurden weitgehend nach der Methode von McKeel und Jarett (1970) gewonnen. Dabei werden die isolierten Fettzellen homogenisiert, das Fett und die Zellkerne durch Zentrifugation abgetrennt und die Plasmamembranen mittels Dichtegradientenzentrifugation konzentriert.

Beschreibung: Die Fettzellen wurden analog der im Abschnitt 2.6. beschriebenen Methode isoliert. Für eine Präparation wurde das Nebenhodenfettgewebe von 18 - 22 männlichen Sprague-Dawley-Ratten (160 -180 g) entnommen und in einem Plastikgefäß mit 10,0 ml KRB-Albumin 1 %-Puffer (pH 7,4; 37°C), der zusätzlich 0,05 % Glucose enthielt, aufgenommen. Das Gewebe wurde gewogen, wobei ein Gesamtgewicht von 18,0 g nicht überschritten wurde. Das Gewebe wurde, um die Oberfläche zu vergrößern, in kleinere Stücke zerschnitten und in 40,0 ml KRB-Albumin-1%-Puffer, der 0,05 % Glucose sowie Kollagenase (5 mg/g Fettgewebe) enthielt, bei 37°C im Schüttelwasserbad (Schüttelfrequenz 120/min) 45 min lang inkubiert. Anschließend wurde das Inkubat durch ein Nylonnetz (Maschendurchmesser 0,3 mm) gegeben, wobei mit 20 ml KRB-Albumin 1%-Puffer nachgespült wurde. Die Fettzellsuspension wurde 2 min bei 145 x g (Christ-Zentrifuge) zentrifugiert; der Unterstand wurde

abgesaugt. Die Fettzellen wurden noch dreimal mit 15,0 ml KRB-Albumin 1%-Puffer gewaschen.

Nach dem letzten Waschvorgang wurde der Unterstand abgesaugt und die konzentrierte Fettzellsuspension mit dem 3fachen Volumen kalter Lösung I (+ 4°C) versetzt. Alle weiteren Arbeitsgänge wurden unter Kühlung (Eisbad oder Kälteraum mit + 4°C) ausgeführt. Die Fettzellsuspension wurde anschließend 10 min lang unter Eiskühlung in einem Glashomogenisatorgefäß (Inhalt 55 ml) mit einem Teflonstempel bei Stufe 3,5, das entspricht einer Drehzahl von 175/min und einer Hubzahl von 29/min bei einer Hubhöhe von 60 mm, im Colora-Zell-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenisat wurde 30 min bei 20.000 x g (Sorvall-Zentrifuge) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10,0 ml eiskalter Lösung I resuspendiert. Das resuspendierte Sediment wurde 10 min bei 1000 x g (Mistral-Zentrifuge) zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand wurde wieder 30 min bei 20.000 x g (Sorvall-Zentrifuge) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 6,0 ml eiskalter Lösung I resuspendiert und in Portionen von jeweils 3,0 ml vorsichtig über zwei Dichtegradienten geschichtet. Die Dichtegradienten wurden 60 min bei 60.000 x g (MSE-Ultrazentrifuge mit Ausschwingrotor) zentrifugiert. Die Plasmamembranen, die eine weiß-graue Bande bildeten, wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen und mit Lösung I so verdünnt, daß ein Gesamtvolumen von 40 ml erhalten wurde.

Die Membransuspension wurde 30 min bei 100.000 x g (MSE-Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 - 7 ml Lösung II resuspendiert und in Portionen von 200 µl im Alkoholbad bei -37°C eingefroren.

Die Membranen waren bei Temperaturen unter -18°C ohne wesentlichen Aktivitätsverlust mehrere Monate haltbar.

2.10. Proteinbestimmung von Plasmamembranen

Die Proteinbestimmung erfolgte weitgehend nach den Angaben von Lowry und Mitarbeitern (1951). Die Methode basiert auf der Kombination zweier verschiedener Reaktionen, die nacheinander durchgeführt werden. Die erste Reaktion beruht darauf, daß die Peptidgruppierung mit Kupferionen im alkalischen Milieu den rotvioletten Biuretkomplex bildet. Die zweite Reaktion beruht auf der Reduktion von Phosphormolybdänsäure und Phosphorwolframsäure zu Molybdän- bzw. Wolframblau durch die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. In dieser Kombination ist die Methode 100fach empfindlicher als die Biuret-Methode allein. Die Extinktion der blau gefärbten Lösung wird gemessen.

Beschreibung: Die Versuche wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. 50 µl Plasmamembransuspension wurden mit 50 µl Lösung II verdünnt. Dieser Verdünnung wurden 700 µl einer 10 %igen Na_2CO_3-Lösung sowie 100 µl einer 0,1 %igen $CuSO_4$ x 5 H_2O-Lösung zugesetzt. Der Ansatz wurde gemischt und 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurden 100 µl Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (1:3 verdünnt) zugesetzt und sofort mit dem Ansatz vermischt (Rotationsmischer). Das Reaktionsgemisch wurde 5 min bei 37°C inkubiert und anschließend 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen; danach wurde die Extinktion bei 578 nm (Eppendorf-Photometer) gemessen.

Mit Rinderserumalbumin (0,1 und 0,2 mg in 100 µl Lösung II) wurden Eichwerte, mit Lösung II wurden Leerwerte bestimmt. Die aus den Doppelbestimmungen hervorgegangenen Werte wurden gemittelt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{mg Protein/ml} = 2\,(EP - EL) \times \frac{0,3}{(EE - 2\,EL)}$$

wobei gilt:

EP: Extinktion der Probe
EL: Extinktion des Leerwertes
EE: Summe der Extinktionen der Eichstandardwerte (0,1 und 0,2 mg Albumin)

2.11. Messung der Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle

Die Messung der Adenylatzyklaseaktivität erfolgte weitgehend nach der Methode von Schwabe und Mitarbeitern (1974) unter Verwendung der cAMP-Bestimmungsmethode von Gilman (1970). Dabei werden den Plasmamembranen ATP und Mg^{2+} zugesetzt, die dem Enzym in Form eines Mg-ATP-Komplexes als Substrat dienen. Der Ansatz enthält ferner Creatinphosphat und Creatinkinase, die als "ATP-regerierendes System" das von den membranständigen ATPasen abgebaute Substrat-ATP wieder zu ATP phosphorylieren, so daß während der Inkubation eine ATP-Konzentration aufrechterhalten wird, die 75-80 % der eingesetzten ATP-Konzentration beträgt. Die Reaktion verläuft bei pH 7,4 in Tris-gepuffertem Milieu und wird durch Hitzestop bei 95°C beendet. Das vom Enzym gebildete cAMP wird mit der Proteinbindungs-Methode (Gilman, 1970) bestimmt.

Beschreibung: Der Inkubationsansatz (200 µl Endvolumen) enthielt: 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,4); 20 mM $MgSO_4$; 0,2 mg Rinderserumalbumin; 5 mM Creatinphosphat; 10 µg Creatinkinase; 0,5 mM ATP; 6 - 12 µg Plasmamembranprotein sowie die in den Abbildungen oder Tabellen näher bezeichneten Substanzen. Die Ansätze wurden ohne Plasmamembranen 5 min lang bei 30°C vorinkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe der frisch aufgetauten Plasmamembranen gestartet.

In jedem Versuch wurden Leerwerte (3 Ansätze) und Wiederauffindungen (3 Ansätze mit je 25 pmol cAMP/200 µl) mitbestimmt, die hitzeinaktivierte Plasmamembranen (6 - 12 µg Protein/200 µl) enthielten, um gleiche Bedingungen wie bei den übrigen Inkubationsansätzen herzustellen.

Zur Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen wurde die Inkubation nach 6 min bei 30°C, zur Untersuchung der Zeit-Wirkungsbeziehungen nach den in den Abbildungen angegebenen Zeiten beendet, indem die Ansätze 3 min lang bei

95°C erhitzt wurden.

In Versuchen mit 5'-Guanylylimidodiphosphat wurden folgende Inkubationszeiten bzw. -temperaturen gewählt: 5 min Vorinkubation bei 37°C ohne Plasmamembranen und, nach Zusatz der Membranen, 10 min Hauptinkubation bei 37°C, um die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zu untersuchen oder verschiedene in den Abbildungen angegebene Hauptinkubationszeiten bei 37°C, um die Zeit-Wirkungsbeziehungen zu untersuchen.

Nach dem Hitzestop wurden die Ansätze auf Eis gekühlt, mit jeweils 400 µl Na-Acetatpuffer (50 mM; pH 4,0) verdünnt und 2 min lang bei 8000 x g (Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert. 50 µl Aliquots des Überstandes wurden für die cAMP-Bestimmungsmethode (Gilman, 1970; s. Abschnitt 2.7.) verwendet, die als Doppelbestimmung, d.h. pro Ansatz zwei Proben, durchgeführt wurde.

Die cAMP-Eichstandardwerte enthielten jeweils 50 µl Aliquots aus dem Überstand der Leerwertansätze, so daß für die Eichstandardwerte gleiche Bedingungen (Salzkonzentration, usw.) galten wie für die übrigen Werte.

Keine der untersuchten Substanzen (Nukleoside, Stimulatoren, usw.) interferierten in den aliquoten Konzentrationen mit der cAMP-Bestimmungsmethode.

Die Adenylatzyklaseaktivität wurde in Konzentrations-Wirkungskurven als pmol cAMP/mg Protein x min angegeben. In analogen Versuchen mit 5'-Guanylylimidodiphosphat wurde die Adenylatzyklaseaktivität als nmol cAMP/mg Protein x 10 min angegeben.

Bei allen Zeit-Wirkungskurven wurden die Werte in nmol cAMP/mg Protein angegeben.

2.12. Dünnschichtchromatographische Untersuchung von 2'-Deoxyadenosin und 3'-Deoxyadenosin

2'-Deoxyadenosin (Sigma) und 3'-Deoxyadenosin wurden dünnschichtchromatographisch auf Adenosin als mögliche Verunreinigung untersucht.

Zur Dünnschichtchromatographie (DC) wurden DC-Alufolien, Kieselgel 60 F_{254} (20X20 cm; Schichtdicke 0,2 mm) der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Das Fließmittel bestand aus: Chloroform/Methanol/Ammoniak 25 % (80 + 20 + 1, v/v/v). Die DC erfolgte in einer Desaga-Kammer, aufsteigend und unter Kammersättigung. Die zu untersuchenden Nukleoside wurden in Methanol (50 %) gelöst. Aufgetragen wurden jeweils 20 µl. Die Laufstrecke betrug 15 cm. Die Flecken wurden unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht.

Zur Kontrolle wurden der 2'- bzw. 3'-Deoxyadenosin-Lösung (beide 10 mM) jeweils 1 % Adenosin zugesetzt. Wurden jeweils 20 µl dieser Lösungen aufgetragen, so wurde eine Trennung zwischen Adenosin und den beiden Substanzen erreicht, wobei der Adenosin-Fleck noch deutlich sichtbar war; ein solcher Fleck und auch andere Flecken traten bei der Untersuchung der entsprechenden Deoxyadenosin-Lösungen ohne Adenosinzusatz nicht auf. 0,1 % Adenosin waren unter dem UV nicht mehr sichtbar. Folglich sind Verunreinigungen von 2'-Deoxyadenosin und 3'-Deoxyadenosin mit weniger als 1 % Adenosin möglich.

R_f-Werte:

Adenosin: 0,16; 2'-Deoxyadenosin: 0,27; 3'-Deoxyadenosin: 0,29

2.13. Untersuchung des Abbaus von N^6-Methyladenosin durch Adenosindesaminase

Das Enzym Adenosindesaminase katalysiert die folgende Reaktion:

$$\text{Adenosin} + H_2O \longrightarrow \text{Inosin} + NH_3$$

Das Gleichgewicht der Reaktion liegt nahezu vollständig auf der rechten Seite. Die Reaktion läuft in Phosphatpuffer

(pH 7,4) bei Raumtemperatur in wenigen Minuten ab. Das Maximum der Lichtabsorption durch Adenosin liegt bei 265 nm, durch Inosin bei 247 nm, so daß die Umsetzung von Adenosin zu Inosin spektralphotometrisch untersucht werden kann (Übersicht bei Moellering and Bergmeyer, 1970). Diese Methode wurde auch verwendet, um den Abbau von N^6-Methyladenosin durch Adenosindesaminase unter den Bedingungen der Adenosindesaminase-Lipolyse (60 min Inkubation bei 37°C) zu untersuchen. Mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde der Abbau von N^6-Methyladenosin quantitativ untersucht.

Beschreibung: N^6-Methyladenosin, Adenosin und Inosin wurden in Wasser gelöst (jeweils 1 mM). Diese Lösungen dienten als Stammlösungen. Untersucht wurden verschiedene, in Abwesenheit oder Gegenwart von Adenosindesaminase (Endkonzentration 1 µg/ml) behandelte oder unbehandelte Nukleosidproben (Endkonzentration 0,1 mM).

A. Unbehandelte Proben ohne Adenosindesaminase
850 µl K-Phosphatpuffer (50 mM; pH 7,4)
50 µl Wasser
100 µl Nukleosidlösung (1 mM) oder 100 µl Wasser

Die Proben wurden direkt untersucht.

B. Behandelte Proben ohne Adenosindesaminase
850 µl K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4)
50 µl Wasser
100 µl Nukleosidlösung (1 mM) oder 100 µl Wasser

Die Proben wurden 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend 3 min bei 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben untersucht.

C. Behandelte Proben mit Adenosindesaminase (1 µg/ml)
850 µl K-Phosphatpuffer (50 mM; pH 7,4)
50 µl Adenosindesaminase (20 µg/ml)
100 µl Nukleosidlösung (1 mM) oder 100 µl Wasser

Die Proben wurden 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Hitzestop (3 min bei 95°C beendet. Nach dem Abkühlen wurde zentrifugiert (2 min bei 8000 x g ; Eppendorf-Zentrifuge). Der klare Überstand wurde untersucht.

2.13.1. Spektralphotometrie

Verwendet wurde ein Doppelstrahl-Spektralphotometer (Beckman; Modell DB-T) mit angeschlossenem Kompensationsschreiber (Metrawatt Ag; Modell Servogor RE 511). Gemessen wurde im UV-Bereich (340 - 220 nm) unter Verwendung von Quarzküvetten (Hellma, Müllheim/Baden; QS 1,000) mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Gemessen wurde jeweils gegen die entsprechenden Leerwerte, die statt der Nukleosidlösungen das gleiche Volumen Wasser enthielten.

2.13.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde von Herrn Dipl.-Chemiker Dr. F.E. Köster, Institut für Klinische Biochemie und Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Verwendet wurde ein selbstkonstruiertes HPLC-Gerät. Als stationäre Phase wurde ein Kationenaustauscher (Nukleosil SA 5, Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die mobile Phase (wässrig) war folgendermaßen zusammengesetzt: 0,2 M Ammoniumacetat, 0,2 M Essigsäure, 10 % Äthanol. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 12 ml/60 min. Die Säulentemperatur betrug 25°C (Raumtemperatur), der Druck betrug 110 atm. Die Nukleoside wurden mit einem Photometer bei 260 nm detektiert (Zeiss PM 4 mit 8 µl Durchflußküvette, Schichtdicke 1 cm). Die Flächen unter den Peaks wurden automatisch integriert (Spectra Physics, Rechner-Integrator System I). Injiziert wurden 5 µl der 0,1 mM Nukleosidlösungen (= 500 pmol), die mit oder ohne Adenosindesaminase behandelt worden waren (Lösung B bzw. C).

2.14. Statistik

Die Prüfungen auf Signifikanz ($p < 0,05$) erfolgten nach Student's t-Test für verbundene Stichproben. Tabellen und Formeln wurden einem Lehrbuch der Statistik entnommen (Sachs, 1969).

3. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Adenosinderivaten auf den cAMP-Gehalt und die Lipolyse isolierter Fettzellen sowie auf die Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Fettzelle untersucht. Um die Wirkungen dieser Derivate mit denen des natürlichen Nukleosids direkt vergleichen zu können, wurde Adenosin in allen Versuchen mit eingesetzt.

Obwohl alle Versuchsbedingungen wie Tiermaterial, Tierhaltung, Präparation von isolierten Fettzellen sowie Inkubationsbedingungen weitgehend konstant gehalten wurden, zeigten verschiedene Zellpräparationen zum Teil beträchtliche quantitative Unterschiede im cAMP-Gehalt und in der lipolytischen Aktivität, insbesondere unter dem Einfluß lipolytischer Stimulatoren. Ähnliches wurde für die Adenylatzyklaseaktivität verschiedener Membranpräparationen beobachtet. Diese Variationen hatten jedoch keinen wesentlichen Einfluß auf die Hemmbarkeit des cAMP-Gehaltes, der Lipolyse oder der Adenylatzyklaseaktivität durch Adenosin und seine Derivate. Die zur halbmaximalen Hemmung erforderlichen Nukleosidkonzentrationen (IC_{50}-Werte) erwiesen sich als relativ konstant. In der vorliegenden Arbeit werden Adenosinderivate mit Adenosin verglichen und dabei als stärker oder schwächer wirksam beurteilt. Dieser Vergleich bezieht sich auf die zur halbmaximalen Hemmung erforderlichen molaren Nukleosidkonzentrationen.

3.1. Versuche mit isolierten Fettzellen

Die Wirksamkeit lipolytischer Stimulatoren auf cAMP-Gehalt und Lipolyse von Fettzellen ist in starkem Maße von der verwendeten Fettzellkonzentration abhängig. Dies beruht im wesentlichen auf der Freisetzung von Adenosin aus isolierten Fettzellen (Schwabe et al., 1973). Um den Einfluß von freigesetztem Adenosin gering zu halten, wurden die Versuche bei einer niedrigen Fettzellkonzentration

(35 000 ± 5 000 Zellen/ml) durchgeführt. Die Wirkung lipolytischer Stimulatoren auf cAMP-Gehalt und Lipolyse bei der verwendeten Fettzellkonzentration wurde in Konzentrations-Wirkungskurven und Zeit-Wirkungskurven untersucht.

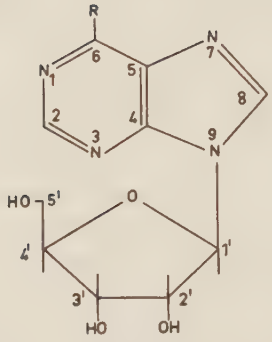
3.1.1. N^6-substituierte Adenosinderivate

Abbildung 2 zeigt die Strukturformeln der untersuchten N^6-monosubstituierten Adenosinderivate. Unter den sechs Derivaten befinden sich zwei mit aliphatischer Seitenkette (N^6-Methyl-Ad und N^6-n-Propyl-Ad), eines mit alicyclischer Seitenkette (N^6-Cyclohexyl-Ad) und drei mit aromatischer Seitenkette (N^6-Phenyl-Ad, N^6-Benzyl-Ad und N^6-O-Xylyl-Ad) in der N^6-Position des Adenosinmoleküls. Die Reihenfolge, in der Adenosin und die N^6-substituierten Derivate in dieser Abbildung aufgeführt sind, orientiert sich nicht an einer chemischen oder physiko-chemischen Systematik, wie z.B. Struktur, Lipophilie oder Molekülgröße des Substituenten, sondern entspricht - von oben nach unten - der biologischen Wirksamkeit dieser Verbindungen als Inhibitoren der cAMP-Bildung und der Lipolyse.

3.1.1.1. Einfluß auf den durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt

Der cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen wurde mit Noradrenalin erhöht. Abbildung 3 zeigt eine typische Konzentrations-Wirkungskurve von Noradrenalin auf den cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen. Der Effekt des Noradrenalins beginnt deutlich bei einer Konzentration von 0,1 µM und erreicht ein Maximum bei einer Konzentration von 1 µM. Auch in Wiederholungsversuchen erwies sich 1 µM Noradrenalin reproduzierbar als maximal wirksame Konzentration, während in den einzelnen Versuchen unterschiedlich hohe cAMP-Spiegel erreicht wurden.

Abbildung 4 zeigt den zeitlichen Verlauf der Wirkung von 1 µM Noradrenalin auf den cAMP-Gehalt isolierter



R	Verbindung
-NH-(H)	N^6-Cyclohexyl-Ad
$-NH-CH_2-CH_2-CH_3$	N^6-n-Propyl-Ad
-NH-(C$_6$H$_5$)	N^6-Phenyl-Ad
$-NH_2$	Adenosin (Ad)
$-NH-CH_3$	N^6-Methyl-Ad
$-NH-CH_2-$(o-H_3C-C$_6$H$_4$)	N^6-o-Xylyl-Ad
$-NH-CH_2-$(C$_6$H$_5$)	N^6-Benzyl-Ad

Abb. 2: Strukturformeln von Adenosin (Ad) und N^6-substituierten Adenosinderivaten.

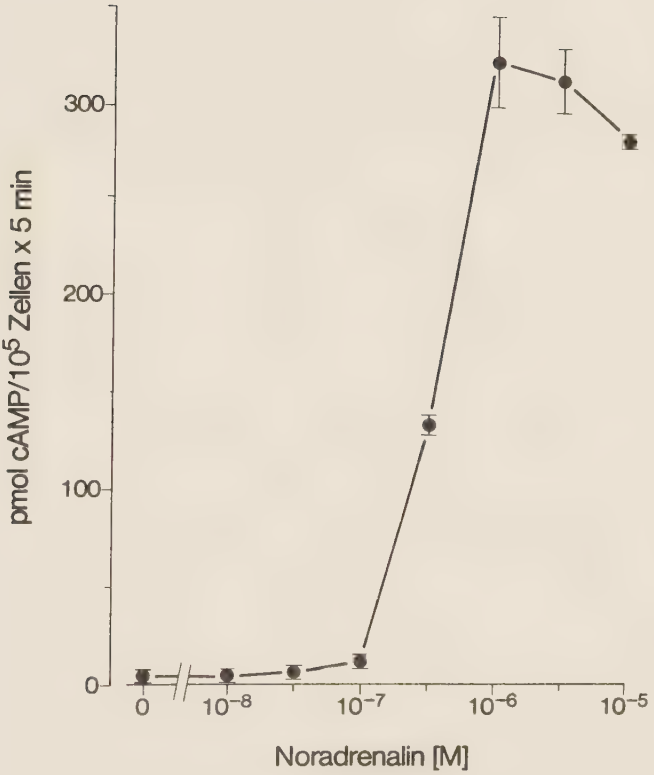


Abb. 3: Konzentrations-Wirkungskurve von (-)-Noradrenalin auf den cAMP-Gehalt von isolierten Rattenfettzellen. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3-4) + mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Zellpräparation.

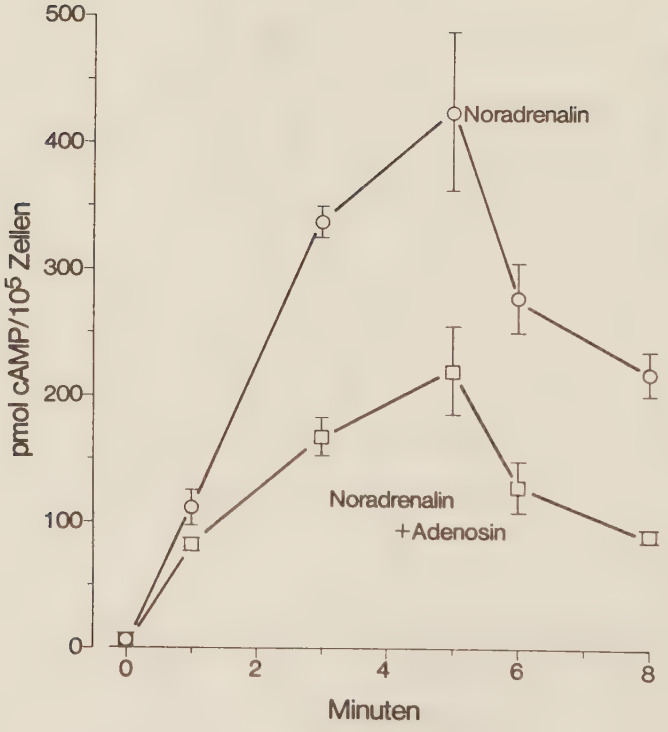


Abb. 4: Zeit-Wirkungskurve von (-)-Noradrenalin (1 µM) auf den cAMP-Gehalt von isolierten Rattenfettzellen in Abwesenheit (○—○) und Gegenwart (□—□) von Adenosin (0,01 µM). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Zellpräparation.

Fettzellen. Die Wirkung des Katecholamins setzte unmittelbar ein. Der cAMP-Gehalt erreichte ein Maximum nach 5 Minuten, um danach wieder abzufallen. Das Profil der Zeit-Wirkungskurve des Noradrenalins wurde nach Zusatz einer halbmaximal wirksamen Konzentration von Adenosin nicht wesentlich verändert. Der Maximaleffekt des Noradrenalins trat ebenfalls nach 5 Minuten ein, wurde jedoch durch 0,01 µM Adenosin um ungefähr 50 % reduziert. Der Einfluß der Nukleoside auf den durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen wurde auf Grund der Zeit-Wirkungskurve nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten gemessen.

Abbildung 5 zeigt die inhibitorische Wirkung von N^6-Cyclohexyladenosin, Adenosin und N^6-Methyladenosin auf den cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen nach maximaler Stimulation durch 1 µM Noradrenalin. Obwohl alle untersuchten N^6-substituierten Adenosinderivate den durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt konzentrationsabhängig und nahezu vollständig hemmten, werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Effekte von N^6-Cyclohexyladenosin und N^6-Methyladenosin gezeigt. Diese beiden Verbindungen können hinsichtlich ihrer Wirkungen an isolierten Fettzellen als repräsentative Vertreter der untersuchten N^6-substituierten Adenosinderivate angesehen werden: N^6-Cyclohexyladenosin war immer stärker wirksam als Adenosin, N^6-Methyladenosin war hingegen immer schwächer wirksam als Adenosin. Die Beurteilung "stärker" oder "schwächer" wirksam beruht hier und im weiteren Verlauf der Arbeit auf einem Vergleich der Wirkung von Nukleosidderivaten gegenüber der Wirkung von Adenosin auf der Basis equieffektiver molarer Konzentrationen.

Tabelle 1 (linke Spalte) zeigt die IC_{50}-Werte von Adenosin und allen N^6-substituierten Adenosinderivaten bei maximaler Erhöhung des cAMP-Gehalts isolierter Fettzellen durch 1 µM Noradrenalin. Ganz allgemein wird der IC_{50}-Wert (inhibitory concentration 50 %) als diejenige Konzentration einer Substanz definiert, die einen bestimmten Ausgangswert um 50 % zu

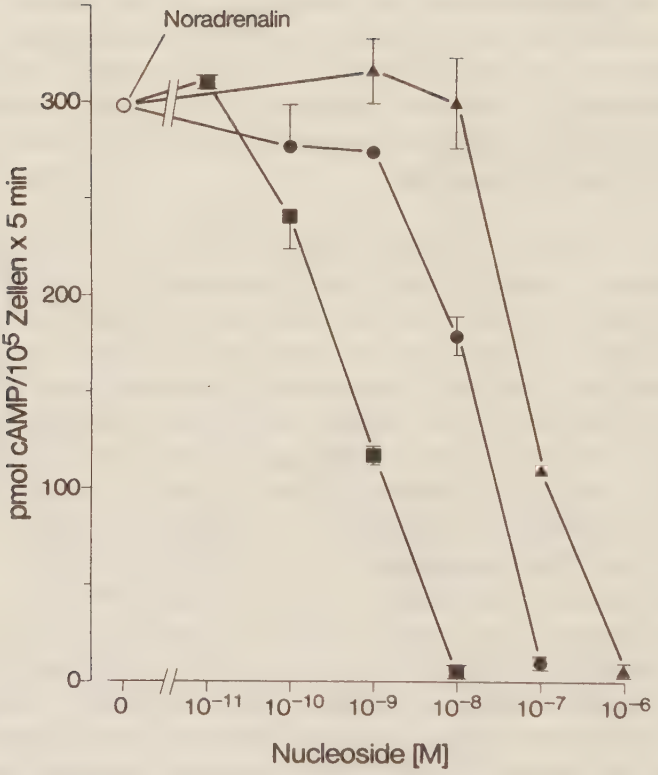


Abb. 5: Wirkung von N^6-Cyclohexyladenosin (■ – ■), Adenosin (● – ●) und N^6-Methyladenosin (▲ – ▲) auf den durch (-)-Noradrenalin (1 µM) erhöhten cAMP-Gehalt von isolierten Rattenfettzellen. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 2-3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes für n = 3 und stammen aus einer Zellpräparation. Der Basalwert (nicht gezeigt) betrug 5,1 pmol cAMP/10^5 Zellen x 5 min (n = 2). Offenes Symbol: cAMP-Gehalt in Gegenwart von 1 µM (-)-Noradrenalin.

Tabelle 1:

IC_{50}-Werte und IC_{25}-Werte von Adenosin (Ad) und N^6-substituierten Adenosinderivaten. Linke Spalte: IC_{50}-Werte bei maximaler Erhöhung des cAMP-Gehalts von isolierten Rattenfettzellen durch (-)-Noradrenalin (NOR, 1 µM). Mittlere Spalte: IC_{50}-Werte bei maximaler Stimulation der Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen durch Theophyllin (THEO, 1 mM). Rechte Spalte: IC_{25}-Werte bei submaximaler Stimulation der Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen durch (-)-Noradrenalin (NOR, 0,3 µM). Einzelheiten s. Methodik. IC_{50}- resp. IC_{25}-Werte werden als negative Logarithmen derjenigen molaren Nukleosidkonzentrationen angegeben, die eine 50 %-ige resp. 25 %-ige Hemmung der stimulierten Bezugswerte bewirken. Die Werte für die Adenosinderivate sind Mittelwerte (n = 2-6) und stammen aus 2-6 verschiedenen Konzentrations-Wirkungskurven mit jeweils 2 oder 3 Einzelinkubaten für jede Konzentration; die Werte für Adenosin sind Mittelwerte aus 7-15 verschiedenen Kurven. P_{REL}: relative Wirkungsstärke bezogen auf Adenosin.

Nukleoside	cAMP (NOR 1 µM)		Lipolyse (THEO 1 mM)		Lipolyse (NOR 0,3 µM)	
	IC_{50}	P_{REL}	IC_{50}	P_{REL}	IC_{25}	P_{REL}
N^6-Cyclohexyl-Ad	9,2	12,6	7,0	12,6	8,3	12,6
N^6-n-Propyl-Ad	8,7	4,0	6,7	6,3	8,1	8,0
N^6-Phenyl-Ad	8,5	2,5	6,1	1,6	8,0	6,3
ADENOSIN (Ad)	8,1	1,0	5,9	1,0	7,2	1,0
N^6-Methyl-Ad	7,2	0,13	5,2	0,2	6,4	0,16
N^6-o-Xylyl-Ad	7,3	0,16	4,7	0,06	6,0	0,06
N^6-Benzyl-Ad	6,9	0,06	4,5	0,04	5,7	0,03

hemmen vermag. Die IC_{50}-Werte der Nukleoside wurden aus Konzentrations-Wirkungskurven ermittelt und als negative Logarithmen der molaren Konzentrationen angegeben. Für Adenosin ergab sich ein mittlerer IC_{50}-Wert von 8,1, d.h. bei einer mittleren Konzentration von 7,94 x 10^{-9}M konnte Adenosin den stimulatorischen Effekt des Noradrenalins um 50 % reduzieren. Aus den Differenzen zwischen den IC_{50}-Werten der N^6-substituierten Adenosinderivate und dem IC_{50}-Wert des Adenosins wurden die relativen Wirkungsstärken der Derivate im Vergleich zu Adenosin (P_{REL}-Werte) berechnet. Im Vergleich zu Adenosin erwies sich N^6-Cyclohexyladenosin als 12,6-fach stärker, N^6-n-Prolyladenosin als 4-fach stärker und N^6-Phenyladenosin als 2,5-fach stärker wirksam. Hingegen waren die folgenden Derivate schwächer wirksam als Adenosin: N^6-Methyladenosin 7,7-fach, N^6-O-Xylyladenosin 6,3-fach und N^6-Benzyladenosin 16,7-fach.

Die basalen cAMP-Werte lagen in einem Bereich von 2-10 pmol cAMP/10^5 Zellen x 5 min. Der Einfluß von Adenosin und N^6-substituierten Adenosinderivaten auf den basalen cAMP-Gehalt wurde nicht untersucht. Auf diese Untersuchungen wurde verzichtet, nachdem Stock und Prilop (1974) in Experimenten mit N^6-Phenylisopropyladenosin gefunden hatten, daß dieses Derivat keine einheitliche Wirkung auf die basalen cAMP-Spiegel zeigte: Die Werte waren meist unverändert, teilweise leicht erhöht und teilweise erniedrigt.

3.1.1.2. Einfluß auf die durch Noradrenalin stimulierte Lipolyse

Der Einfluß von Adenosin und N^6-substituierten Adenosinderivaten auf die durch Noradrenalin stimulierte Lipolyse isolierter Fettzellen wurde untersucht. Als Maß für die Lipolyse isolierter Fettzellen wurde freies Glyzerin bestimmt. Glyzerin und freie Fettsäuren entstehen bei der enzymatischen Hydrolyse der Triglyceride. Während freie Fettsäuren zu

Triglyceriden reverestert werden können, kann das Fettgewebe anfallendes Glyzerin praktisch nicht wiederverwerten, so daß die Glyzerinabgabe als direktes Maß für die Lipolyserate isolierter Fettzellen gilt (Kappeler, 1966).

Abbildung 6 zeigt die konzentrationsabhängige Wirkung von Noradrenalin auf die Lipolyse isolierter Fettzellen. Der Effekt des Noradrenalins begann bei einer Konzentration von 3×10^{-8}M und erreichte ein Maximum bei einer Konzentration von 3×10^{-6}M. Auch in Wiederholungsversuchen wurde ein ausgeprägter maximaler Effekt des Noradrenalins meist bei einer Konzentration von 3×10^{-6}M beobachtet, während der Maximaleffekt auf den cAMP-Gehalt bereits bei einer Konzentration von 10^{-6}M Noradrenalin eintrat.

Im Gegensatz zum cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen, der bei maximaler Erhöhung durch 1 µM Noradrenalin nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wieder abzufallen beginnt (Abb.4), ergibt die Zeit-Wirkungskurve der gleichen Konzentration Noradrenalin auf die Lipolyse ein völlig anderes Bild. Abbildung 7 zeigt den zeitlichen Verlauf der basalen und der durch Noradrenalin stimulierten Lipolyse isolierter Fettzellen. Nach Zusatz von 1 µM Noradrenalin wurde die Lipolyse über 60 Minuten lang aktiviert, während sich die basale Lipolyse innerhalb dieser Zeit nicht nennenswert änderte. Der Unterschied zwischen basaler und stimulierter Lipolyse wurde nach 10 Minuten deutlich und war nach 60 Minuten stark ausgeprägt. Die Wirkung der Nukleoside auf die durch Noradrenalin stimulierte Lipolyse wurde daher nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten untersucht.

Wurden Lipolyse und cAMP-Bildung isolierter Fettzellen durch 1 µM Noradrenalin stimuliert, so zeigte Adenosin zwar eine starke inhibitorische Wirkung auf den cAMP-Gehalt, hatte jedoch kaum einen Einfluß auf die Lipolyse. Abbildung 8 zeigt, daß bei einer Adenosinkonzentration von 10^{-7}M bereits eine ca. 85 %-ige Hemmung des maximal erhöhten cAMP-Gehalts

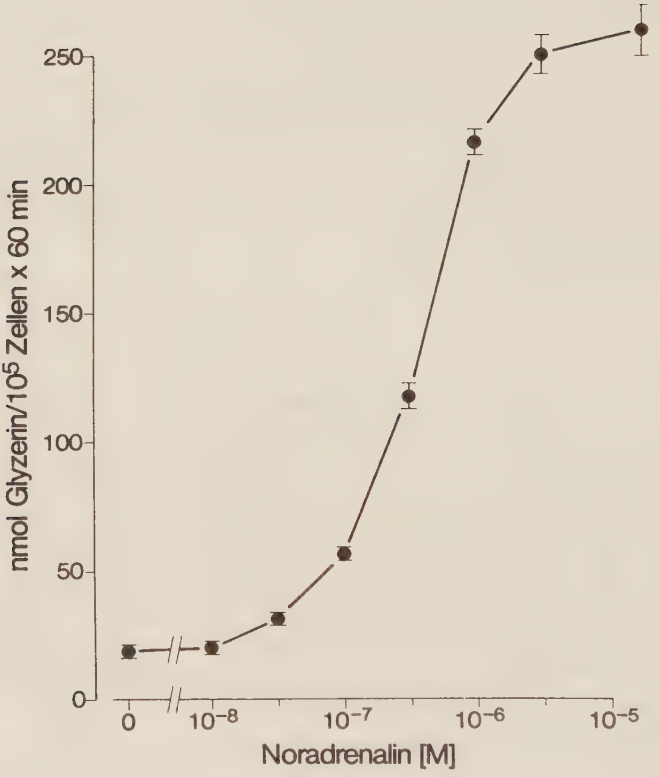


Abb. 6: Konzentrations-Wirkungskurve von (-)-Noradrenalin auf die Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 4) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Zellpräparation.

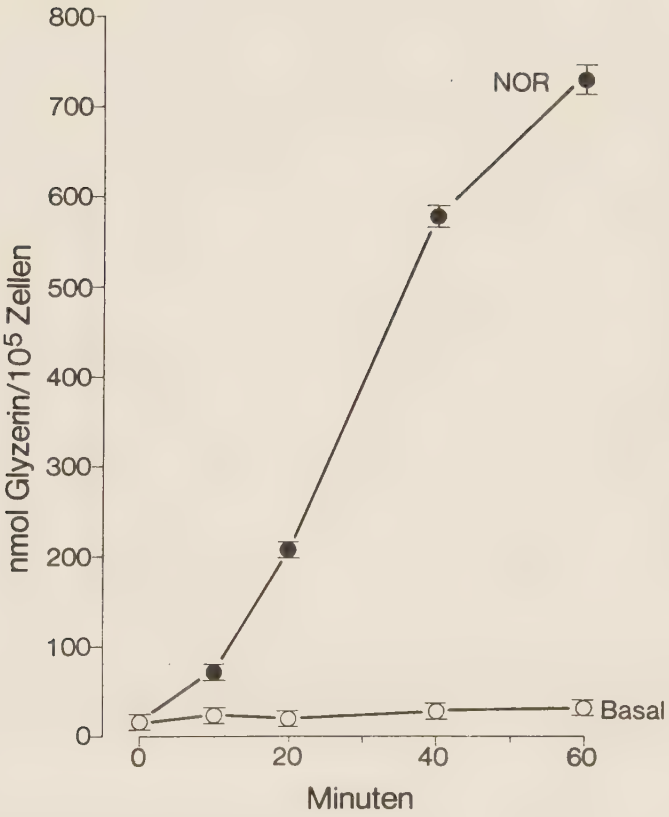


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen in Abwesenheit (offene Symbole) und Gegenwart (geschlossene Symbole) von (-)-Noradrenalin (1 µM). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Zellpräparation.

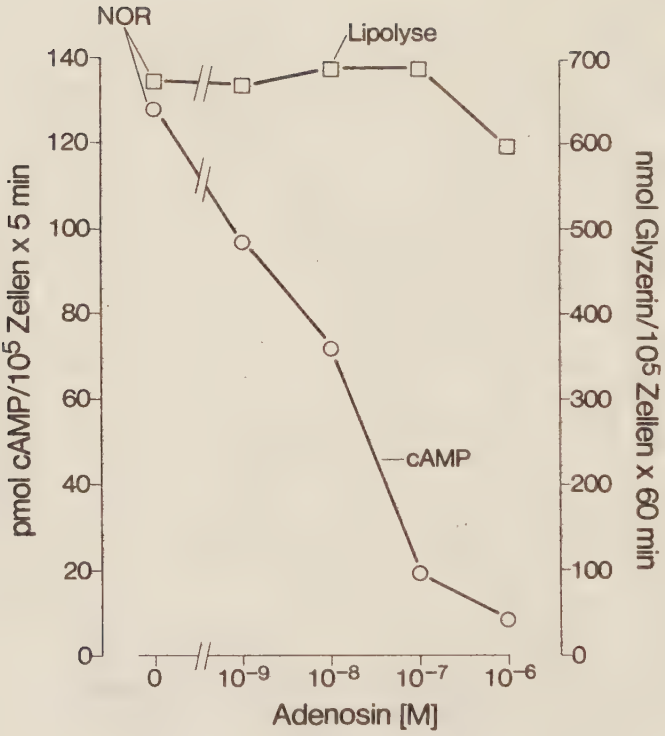


Abb. 8: Wirkung von Adenosin auf den cAMP-Gehalt (O—O) und die Lipolyse (□—□) von isolierten Rattenfettzellen in Gegenwart von (-)-Noradrenalin (1 µM). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 2) und stammen aus einer Zellpräparation. Die Basalwerte (nicht gezeigt) betrugen 1,3 pmol cAMP/10^5 Zellen x 5 min (n = 2) bzw. 32,0 nmol Glyzerin/10^5 Zellen x 60 min (n = 2).

eingetreten war, während die gleiche Konzentration die annähernd maximal stimulierte Lipolyse unbeeinflußt ließ. Erst bei einer Konzentration von 10^{-6}M bewirkte Adenosin eine leichte Hemmung der Lipolyse. Analoge Ergebnisse wurden mit allen untersuchten N^6-substituierten Adenosinderivaten beobachtet: Unabhängig von ihrer Wirksamkeit als Hemmstoffe erhöhter cAMP-Spiegel zeigten die Derivate keine nennenswerte Hemmung der Lipolyse nach Stimulation durch 1 µM Noradrenalin. Diese Dissoziation zwischen cAMP-gehalt und Lipolyse isolierter Fettzellen durch eine bestimmte Klasse von antilipolytisch wirksamen Substanzen ist bekannt und wird durch Befunde der vorliegenden Arbeit bestätigt. Stock und Prilop (1974) konnten die unterschiedliche Wirkung von N^6-Phenylisopropyladenosin auf den cAMP-Gehalt und die Lipolyse isolierter Fettzellen nach maximaler Stimulation durch 3 µM Noradrenalin zeigen. Bis zu einer Konzentration von 10^{-6}M zeigte N^6-Phenylisopropyladenosin keine Hemmwirkung auf die Lipolyse, obgleich der cAMP-Gehalt bei gleicher Konzentration des Derivates fast vollständig gehemmt wurde. Ebenfalls konnten Stock und Prilop (1974) zeigen, daß eine durch submaximale Konzentrationen von Noradrenalin stimulierte Lipolyse durch N^6-Phenylisopropyladenosin partiell gehemmt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Wirkung der Nukleoside nach Stimulation der Lipolyse durch 0,3 µM Noradrenalin als submaximal wirksame Konzentration (s. Abb.6) untersucht.

Abbildung 9 zeigt den Einfluß von N^6-Cyclohexyladenosin, Adenosin und N^6-Methyladenosin auf die durch 0,3 µM Noradrenalin stimulierte Lipolyse isolierter Fettzellen. Im Vergleich zu Adenosin erwies sich N^6-Cyclohexyladenosin wieder als stärker wirksam, N^6-Methyladenosin wieder als schwächer wirksam. Die Hemmwirkung der Nukleoside auf die Lipolyse wurde prozentual dargestellt, wobei die Werte aus mehreren Versuchen stammten. Dabei wurden die durch Noradrenalin stimulierten Ausgangswerte der einzelnen Versuche als 100 % festgesetzt und die Hemmwirkung der Nukleoside

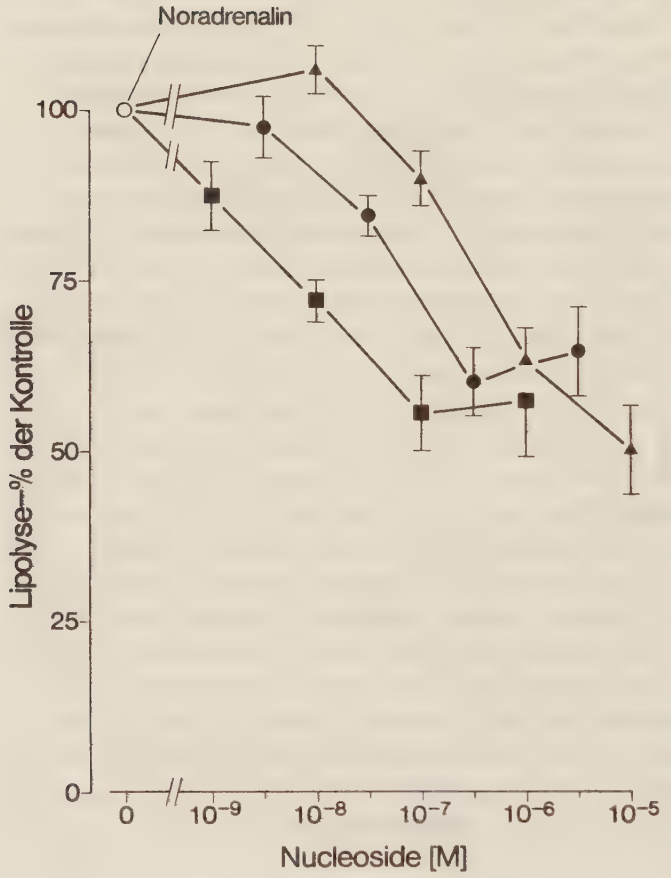


Abb. 9: Wirkung von N^6-Cyclohexyladenosin (■ — ■), Adenosin (● — ●) und N^6-Methyladenosin (▲ — ▲) auf die durch (-)-Noradrenalin (0,3 µM) submaximal stimulierte Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen. Einzelheiten s. Methodik. Der mittlere Bezugswert (Wirkung von (-)-Noradrenalin in Abwesenheit der Nukleoside; offenes Symbol) wurde gleich 100 % gesetzt (Absolutwert: 67,2 ± 9,5 nmol Glyzerin/10^5 Zellen x 60 min). Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3-4) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus 3 - 4 verschiedenen Zellpräparationen mit jeweils 3-fachem Inkubationsansatz. Der Basalwert (nicht gezeigt) in Abwesenheit der Nukleoside betrug 16,5 ± 3,0 nmol Glyzerin/10^5 Zellen x 60 min (n = 8).

prozentual umgerechnet. Dies war erforderlich, da die zur Stimulation der Lipolyse verwendete Noradrenalinkonzentration in einem steilen Abschnitt der Konzentrations-Wirkungskurve liegt (s. Abb.6) und die stimulierten Ausgangswerte verschiedener Versuche dadurch erhebliche Schwankungen im Bereich von 50 - 120 nmol Glyzerin/10^5 Zellen x 60 min zeigten. Die durch 0,3 µM Noradrenalin submaximal stimulierte Lipolyse wurde durch Adenosin und alle N^6-substituierten Adenosinderivate jedoch nur um ungefähr 50 % gehemmt. Diese Beobachtung bestätigt frühere Ergebnisse mit N^6-Phenylisopropyladenosin (Stock and Prilop, 1974).

Da ein maximaler inhibitorischer Effekt der Nukleoside auf die durch 0,3 µM Noradrenalin submaximal stimulierte Lipolyse bereits nach einer 50 %-igen Reduktion der stimulierten Ausgangswerte eintrat, wurden für Adenosin und die N^6-substituierten Adenosinderivate IC_{25}-Werte ermittelt. Die IC_{25}-Werte werden als negative Logarithmen derjenigen molaren Nukleosidkonzentrationen angegeben, die eine 25 %-ige Hemmung der stimulierten Ausgangswerte bewirkten. Diese Werte entsprechen in etwa 50 % des maximalen inhibitorischen Effektes der Nukleoside auf die submaximal stimulierte Lipolyse. Die IC_{25}-Werte von Adenosin und den N^6-substituierten Adenosinderivaten bei submaximaler Stimulation der Lipolyse isolierter Fettzellen durch 0,3 µM Noradrenalin sind in Tabelle 1 (rechte Spalte) aufgeführt. Für Adenosin wurde ein IC_{25}-Wert von 7,2 ermittelt, dies entspricht einer Konzentration von 6,3 x 10^{-8}M. Vergleicht man die Wirksamkeit der Derivate gegenüber Adenosin, so ergeben sich ungefähr ähnliche Verhältnisse wie bei Untersuchungen der Nukleoside auf den durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt. Mit Ausnahme von N^6-O-Xyladenosin wurde sogar die gleiche Reihenfolge erzielt.

3.1.1.3. Einfluß auf die durch Theophyllin stimulierte Lipolyse

Genauso wie mit Noradrenalin kann auch mit Theophyllin eine maximale Stimulation der Lipolyse erreicht werden. Es sind jedoch höhere Konzentrationen von Theophyllin als von Noradrenalin erforderlich.

Abbildung 10 zeigt die Wirkung von Theophyllin auf die Lipolyse isolierter Fettzellen. Der lipolytische Effekt des Theophyllins setzte bei einer Konzentration von 3×10^{-5}M ein und erreichte ein Maximum bei einer Konzentration von 10^{-3}M. In Wiederholungsversuchen ergaben sich ähnliche Konzentrations-Wirkungsbeziehungen, wobei der Maximaleffekt des Theophyllins meist bei einer Konzentration von 10^{-3}M gesehen wurde. Die Zeit-Wirkungskurve von Theophyllin auf die Lipolyse isolierter Fettzellen war nahezu identisch mit der von Noradrenalin. Wie Abbildung 11 zeigt, blieb die durch 1 mM Theophyllin maximal aktivierte Lipolyse über 60 Minuten lang annähernd konstant. Nach dieser Zeit ergab sich ein starker Unterschied zwischen basalen und stimulierten Werten. Die Wirkung der Nukleoside auf die durch Theophyllin stimulierte Lipolyse wurde auf Grund der Zeit-Wirkungskurve nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten untersucht.

Abbildung 12 zeigt die Wirkung von N^6-Cyclohexyladenosin, Adenosin und N^6-Methyladenosin auf die durch 1 mM Theophyllin stimulierte Lipolyse isolierter Fettzellen. Die durch Theophyllin stimulierte Lipolyse wurde durch die Nukleoside konzentrationsabhängig und vollständig bis auf basale Werte gehemmt. N^6-Cyclohexyladenosin war stärker, N^6-Methyladenosin war schwächer antilipolytisch wirksam als Adenosin.

Die IC_{50}-Werte von Adenosin und den untersuchten N^6-substituierten Adenosinderivaten bei maximaler Stimulation der Lipolyse isolierter Fettzellen durch 1 mM Theophyllin

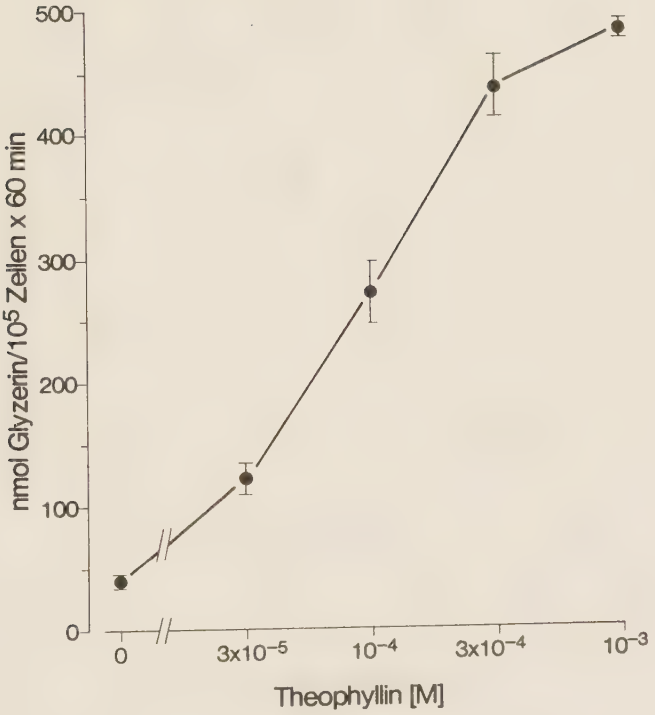


Abb. 10: Konzentrations-Wirkungskurve von Theophyllin auf die Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 4) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Zellpräparation.

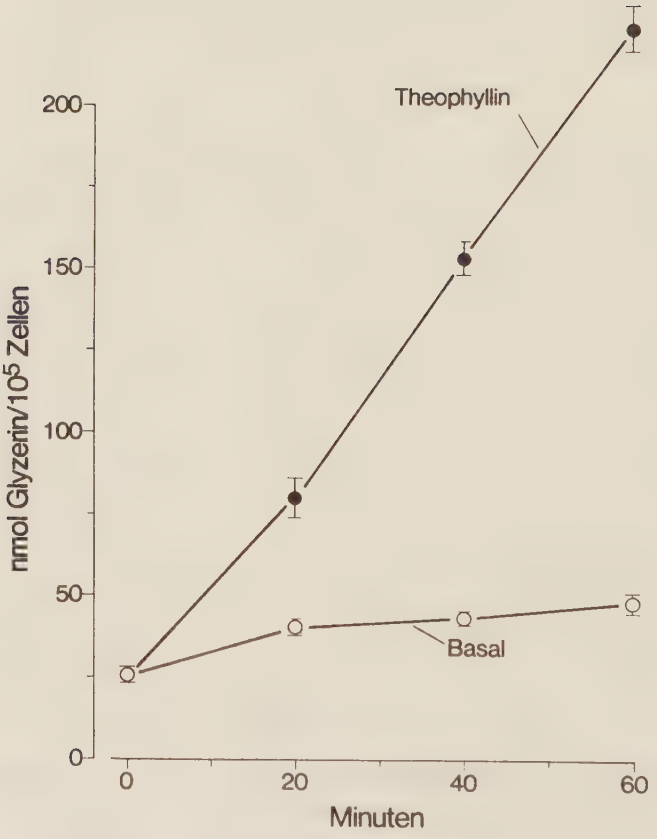


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen in Abwesenheit (offene Symbole) und in Gegenwart (geschlossene Symbole) von Theophyllin (1 mM). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3-4) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Zellpräparation.

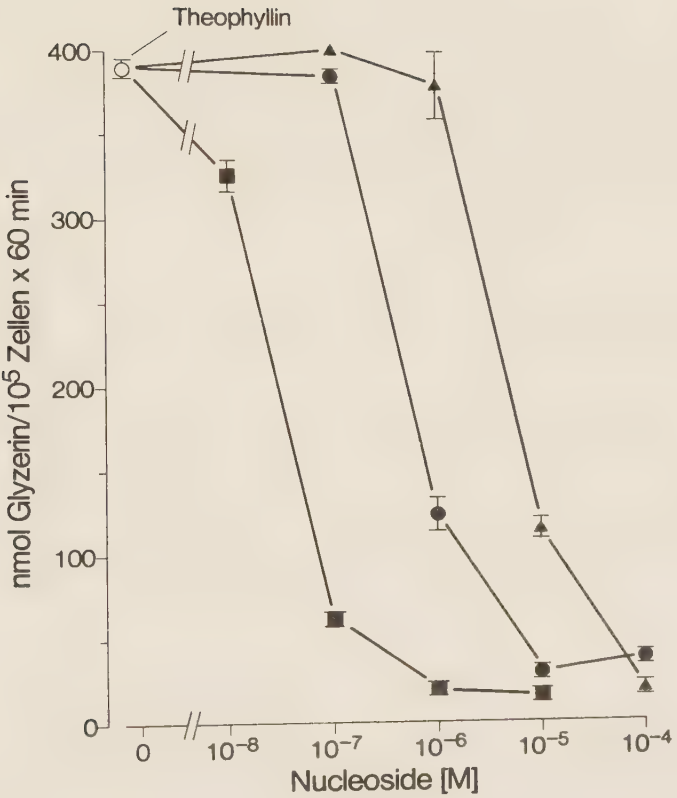


Abb. 12: Wirkung von N^6-Cyclohexyladenosin (■—■), Adenosin (●—●) und N^6-Methyladenosin (▲—▲) auf die durch Theophyllin (1 mM) stimulierte Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 2-3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes für n = 3 und stammen aus einer Zellpräparation. Der Basalwert (nicht gezeigt) in Abwesenheit der Nukleoside betrug 13,8 ± 1,1 nmol Glyzerin/10^5 Zellen x 60 min (n = 3). Offenes Symbol: Lipolyse nach Stimulation durch 1 mM Theophyllin.

sind in Tabelle 1 (mittlere Spalte) aufgeführt. Für Adenosin ergab sich ein IC_{50}-Wert von 5,9 entsprechend einer Konzentration von $1,3 \times 10^{-6}$M. Die P_{REL}-Werte der Nukleoside entsprachen ungefähr denen, die bei den Untersuchungen der Nukleoside auf die durch Noradrenalin stimulierte Lipolyse ermittelt worden waren und sind, mit Ausnahme von N^6-O-Xylyladenosin, auch gut vergleichbar mit den P_{REL}-Werten, die bei den Untersuchungen der Nukleoside auf den durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen ermittelt worden waren.

3.1.1.4. Einfluß auf die durch Adenosindesaminase stimulierte Lipolyse

Adenosindesaminase katalysiert den Abbau von Adenosin zu Inosin, das im Vergleich zu Adenosin über 1000-fach schwächer antilipolytisch wirksam ist (Ebert and Schwabe, 1973). Der Zusatz des Enzyms zum Inkubationsmedium isolierter Fettzellen führt zu einer Stimulation der Lipolyse, da der inhibitorische Einfluß von freigesetztem Adenosin auf das lipolytische System der Fettzelle beseitigt wird (Schwabe and Ebert, 1974).

Nachdem bereits in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, daß N^6-Phenylisopropyladenosin die durch Adenosindesaminase stimulierte Lipolyse hemmte, weil dieses N^6-substituierte Adenosinderivat durch das Enzym nicht abgebaut werden kann (Fain and Wieser, 1975; Prilop, 1976), schien die durch Adenosindesaminase aktivierte Lipolyse ausgezeichnet geeignet, um den "reinen" inhibitorischen Effekt der N^6-substituierten Adenosinderivate unter Ausschaltung der Wirkung von freigesetzem Adenosin zu untersuchen. Ein Vergleich zur Wirkung des Adenosins ist bei diesen Experimenten allerdings nicht möglich.

Abbildung 13 zeigt den Konzentrations-Wirkungsverlauf von Adenosindesaminase auf die Lipolyse isolierter Fettzellen.

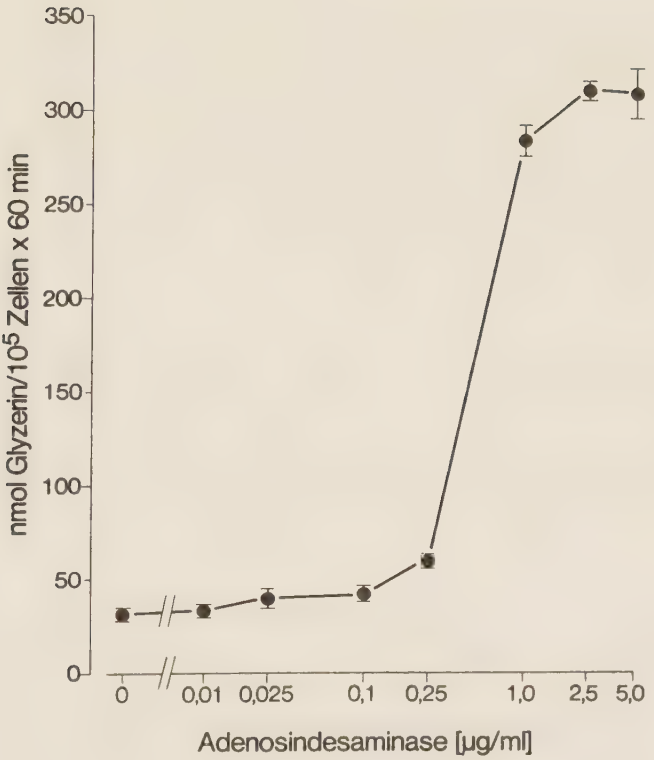


Abb. 13: Konzentrations-Wirkungskurve von Adenosindesaminase auf die Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Zellpräparation.

Bei einer Konzentration von 0,25 µg/ml wurde die lipolytische Wirkung des Enzyms deutlich sichtbar und erreichte ein Maximum im Bereich von 1,0 - 2,5 µg/ml.

Abbildung 14 zeigt den Einfluß von 1 µg/ml Adenosindesaminase auf den zeitlichen Verlauf der Lipolyse isolierter Fettzellen. Der lipolytische Effekt des Enzyms setzte unmittelbar ein und hielt unverändert über 60 Minuten lang an. Nach dieser Zeit ergab sich ein ausgeprägter Unterschied zwischen basalen und stimulierten Werten, so daß der Einfluß der Nukleoside auf die durch Adenosindesaminase stimulierte Lipolyse nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten ermittelt wurde.

Abbildung 15 zeigt die Wirkung von N^6-Cyclohexyladenosin und N^6-Benzyladenosin auf die durch 1 µg/ml Adenosindesaminase stimulierte Lipolyse von isolierten Fettzellen. Der lipolytische Effekt des Enzyms wurde durch die Nukleoside konzentrationsabhängig und nahezu vollständig bis auf basale Werte gehemmt, wobei N^6-Cyclohexyladenosin wesentlich stärker wirksam war als N^6-Benzyladenosin.

Die IC_{50}-Werte der N^6-substituierten Adenosinderivate bei maximaler Stimulation der Lipolyse isolierter Fettzellen durch 1 µg/ml Adenosindesaminase sind in Tabelle 2 aufgeführt. Für N^6-Cyclohexyladenosin wurde ein IC_{50}-Wert von 9,1 ermittelt; das entspricht einer Konzentration von $7{,}9 \times 10^{-10}$M. Demgegenüber erwies sich N^6-Benzyladenosin mit einem IC_{50}-Wert von 6,5 als ungefähr 400-fach schwächer wirksam. Die IC_{50}-Werte von N^6-n-Propyladenosin, N^6-Phenyladenosin und N^6-O-Xylyladenosin lagen zwischen denen von N^6-Cyclohexyladenosin und N^6-Benzyladenosin, wobei die einzelnen Derivate hinsichtlich ihrer Wirksamkeit eine ähnliche Reihenfolge einhielten wie bei den vorangegangenen Untersuchungen (Tabelle 1).

Eine überraschende Ausnahme machte N^6-Methyladenosin, das sich nach Stimulation der Lipolyse durch Adenosindesaminase

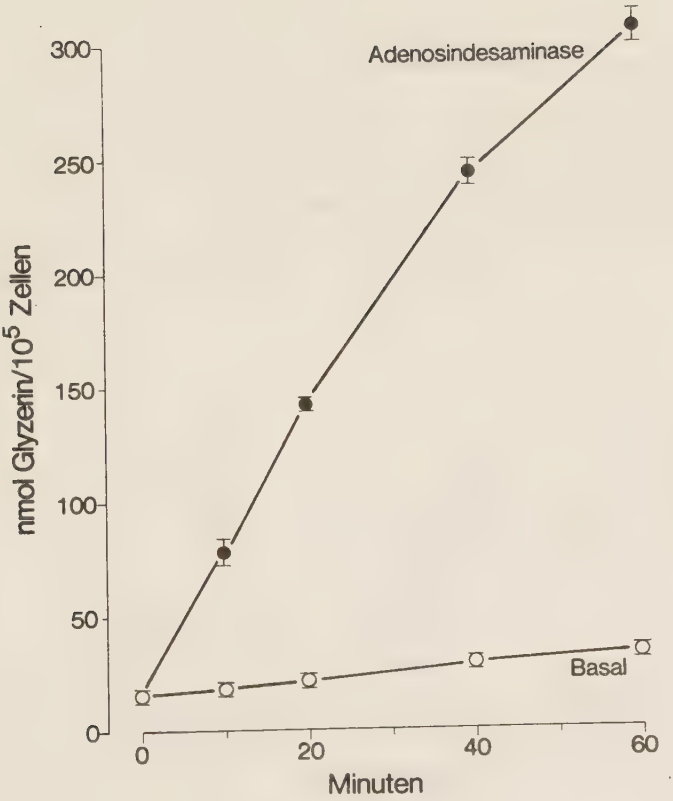


Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der Lipolyse von isolierten Fettzellen in Abwesenheit (offene Symbole) und Gegenwart (geschlossene Symbole) von Adenosindesaminase (1 µg/ml). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3-4) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Zellpräparation.

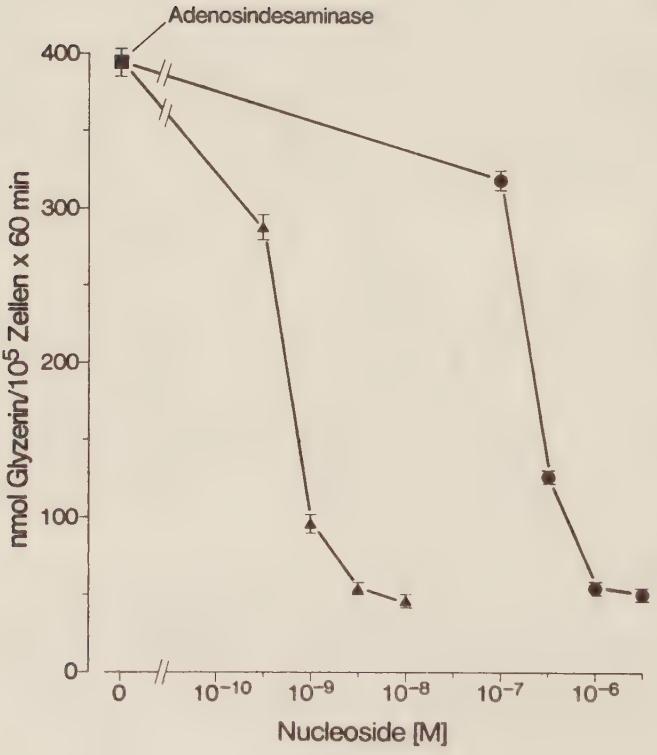


Abb. 15: Wirkung von N^6-Cyclohexyladenosin (▲—▲) und N^6-Benzyladenosin (●—●) auf die durch Adenosindesaminase (1,0 µg/ml) stimulierte Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Zellpräparation. Der Basalwert (nicht gezeigt) in Abwesenheit der Nukleoside betrug 23,0 ± 1,6 nmol Glyzerin/10^5 Zellen x 60 min (n = 3). Rechteckiges Symbol:Lipolyse nach Stimulation durch Adenosindesaminase (1,0 µg/ml).

Tabelle 2:

IC_{50}-Werte von N^6-substituierten Adenosinderivaten bei maximaler Stimulation der Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen durch Adenosindesaminase (ADA; 1,0 µg/ml). Einzelheiten s. Methodik. IC_{50}-Werte werden als negative Logarithmen derjenigen molaren Nukleosidkonzentrationen angegeben, die eine 50 %-ige Hemmung der stimulierten Bezugswerte bewirken. Die Werte sind Mittelwerte (n = 2-4) und stammen aus 2-4 verschiedenen Konzentrations-Wirkungskurven mit jeweils 2-4 Einzelinkubaten für jede Konzentration. inaktiv: keine Hemmung bis 0,1 mM.

Nukleoside	Lipolyse (ADA; 1,0 µg/ml)
	IC_{50}
N^6-Cyclohexyl-Ad	9,1
N^6-n-Propyl-Ad	8,8
N^6-Phenyl-Ad	8,7
ADENOSIN (Ad)	inaktiv
N^6-Methyl-Ad	6,2
N^6-o-Xylyl-Ad	7,1
N^6-Benzyl-Ad	6,5

plötzlich als schwächster Hemmstoff erwies und damit von der sonst erhaltenen Reihenfolge völlig abwich.

3.1.1.5. Abbau von N^6-Methyladenosin durch Adenosindesaminase

Unter Berücksichtigung der bisher gewonnenen Daten und unter der Annahme, daß N^6-O-Xylyladenosin wiederum schwächer als N^6-Methyladenosin wirksam ist (s. Tabelle 1), wäre für N^6-Methyladenosin ein IC_{50}-Wert > 7,1 zu erwarten. Die offensichtliche Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von N^6-Methyladenosin nach Stimulation der Lipolyse durch Adenosindesaminase (IC_{50}= 6,2) deutete darauf hin, daß dieses Derivat durch das Enzym zumindest teilweise inaktiviert wurde. Zur Abklärung dieser Frage wurde das Verhalten von N^6-Methyladenosin gegenüber Adenosindesaminase analytisch untersucht. Dazu wurde N^6-Methyladenosin (0,1 mM) in Abwesenheit oder Gegenwart von Adenosindesaminase (1 µg/ml) bei 37°C inkubiert. Die Inkubation wurde nach 60 Minuten durch Hitzestop beendet. Nach Zentrifugation wurde der Überstand der Inkubate für die Untersuchungen verwendet. In gleicher Weise wurde Adenosin (0,1 mM) behandelt.

Abbildung 16 zeigt die UV-Absorptionsspektren von Adenosin und N^6-Methyladenosin nach Inkubation der Nukleoside mit und ohne Adenosindesaminase. In Abwesenheit von Adenosindesaminase ergab sich für Adenosin das Spektrum 1. Unter den gewählten Bedingungen wies die Absorptionskurve ein Maximum bei 260 nm auf. Das Spektrum war identisch mit einem Spektrum von unbehandeltem Adenosin gleicher Konzentration (nicht gezeigt). Nach Inkubation von Adenosin in Gegenwart von Adenosindesaminase wurde Spektrum 2 aufgenommen, wobei das Absorptionsmaximum bei 247 nm lag. Ein identisches Spektrum mit gleichem Maximum wurde mit unbehandeltem Inosin (0,1 mM) erhalten (nicht gezeigt).

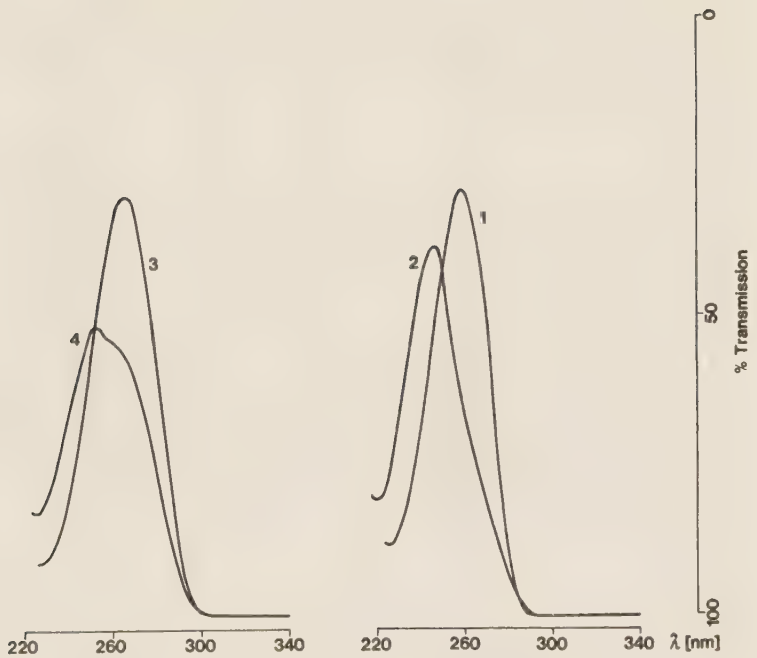


Abb. 16: UV-Absorptionsspektren von Adenosin und N^6-Methyladenosin nach Inkubation der Nukleoside mit und ohne Adenosindesaminase. Spektrum 1: 0,1 mM Adenosin nach Inkubation ohne Adenosindesaminase; λ_{max} = 260 nm. Spektrum 2: 0,1 mM Adenosin nach Inkubation mit Adenosindesaminase (1 µg/ml); λ_{max} = 247 nm. Spektrum 3: 0,1 mM N^6-Methyladenosin nach Inkubation ohne Adenosindesaminase; λ_{max} = 265 nm. Spektrum 4: 0,1 mM N^6-Methyladenosin nach Inkubation mit Adenosindesaminase (1 µg/ml); λ_{max} = 249 nm. Weitere Einzelheiten s. Methodik.

Nach Inkubation von N^6-Methyladenosin ohne Zusatz von Adenosindesaminase wurde Spektrum 3 aufgenommen, das ein Absorptionsmaximum bei 265 nm hatte. Dieses Spektrum zeigte sich identisch mit einem Spektrum von unbehandeltem N^6-Methyladenosin gleicher Konzentration (nicht gezeigt). Nach Inkubation des Derivats in Gegenwart von Adenosindesaminase wurde Spektrum 4 erhalten. Die Absorptionskurve zeigte ein Maximum bei 249 nm mit einer Schulter bei 265 nm. Dieses Ergebnis wies darauf hin, daß N^6-Methyladenosin durch das Enzym nach 60 Minuten teilweise zu Inosin abgebaut werden kann.

Möglich wäre auch ein Abbau zu N^1-Methylinosin. Dabei wird von der Annahme ausgegangen, daß die Methylgruppe von der N^6-Position zur N^1-Position des Moleküls wandern kann, wobei sich ein Gleichgewicht zwischen N^6-Methyladenosin und N^1-Methyladenosin einstellt, das überwiegend auf der Seite von N^6-Methyladenosin liegt. N^1-Methyladenosin mit seiner freien Aminogruppe wäre das eigentliche Substrat der Adenosindesaminase, das dann zu N^1-Methylinosin abgebaut würde. Durch den Abbau würde das Gleichgewicht gestört, sich wieder neu einstellen, so daß dem Enzym immer neues Substrat zur Verfügung stünde.

Mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde der Abbau von N^6-Methyladenosin quantitativ untersucht. Abbildung 17 zeigt ein HPLC-Chromatogramm von N^6-Methyladenosin nach Inkubation des Nukleosids mit und ohne Adenosindesaminase. Peak 1 zeigt den Zeitpunkt der Injektion einer N^6-Methyladenosinprobe, die ohne Zusatz von Adenosindesaminase inkubiert worden war. Nach einer Retentionszeit von 27,6 Minuten erschien das Derivat als Peak 2, dessen Flächenintegral 10160 Flächeneinheiten betrug. Peak 3 zeigt den Zeitpunkt der Injektion einer N^6-Methyladenosinprobe, die 60 Minuten lang in Gegenwart von Adenosindesaminase inkubiert worden war. Der entsprechende Peak trat nach einer Retentionszeit von 28,2 Minuten

Abb. 17: Hochdruckflüssigkeitschromatogramm von N^6-Methyladenosin nach Inkubation des Nukleosids mit und ohne Adenosindesaminase. Peak 1: Injektion von N^6-Methyladenosin (500 pmol). Peak 2: N^6-Methyladenosin-Peak; Retentionszeit R_t = 27,6 min; Fläche unter dem Peak = 10160 Flächeneinheiten. Peak 3: Injektion von N^6-Methyladenosin (500 pmol) nach Inkubation mit Adenosindesaminase (1 µg/ml). Peak 4: N^6-Methyladenosin-Peak; Retentionszeit R_t = 28,2 min; Fläche unter dem Peak = 4129 Flächeneinheiten. Weitere Einzelheiten s. Methodik.

auf. Die Fläche unter diesem Peak betrug nur noch 4129 Flächeneinheiten, d.h. daß die Konzentration von N^6-Methyladenosin nach 60 Minuten Inkubation mit Adenosindesaminase um ca. 60 % abgenommen hatte. Für Adenosin wurde in gleichen Versuchen eine Retentionszeit von 20,2 Minuten ermittelt. Nach Behandlung mit Adenosindesaminase wurde Adenosin jedoch vollständig abgebaut. Die Retentionszeit für Inosin betrug 12,5 Minuten.

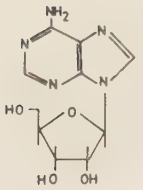
Eine genauere analytische Untersuchung würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen. Zumindest kann auf Grund der analytischen Daten festgestellt werden, daß der für N^6-Methyladenosin ermittelte IC_{50}-Wert bei Stimulation der Lipolyse durch Adenosindesaminase in die vergleichende Untersuchung nicht einbezogen werden darf, da sich dieses Derivat gegenüber dem Enzym als instabil erwies.

3.1.1.6. Einfluß auf die basale Lipolyse

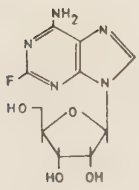
Die basale Lipolyse ergab einen Mittelwert von 35,2 $\pm$ 4,2 nmol Glyzerin/10^5 Zellen x 60 min (n = 38). Die basale Lipolyse wurde durch Adenosin und die untersuchten Derivate zum Teil leicht erhöht, zum Teil leicht erniedrigt, ohne daß ein signifikanter Einfluß ermittelt werden konnte.

3.1.2. Verschiedenartig substituierte Adenosinderivate

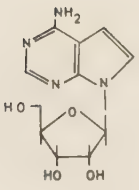
In die vorliegende Untersuchung wurde eine Reihe verschiedenartig substituierter Adenosinderivate einbezogen. Die Strukturformeln dieser Derivate sind in Abbildung 18 gezeigt. 2-Fluoroadenosin, 7-Deazaadenosin und 1,N^6-Ethenoadenosin sind Adenosinanaloge mit modifiziertem Puringerüst, während 3'-Deoxyadenosin, 2'-Deoxyadenosin, 2',5'-Dideoxyadenosin sowie 3'-O-Methyladenosin Modifikationen im glykosidisch gebundenen Ribosezucker des Adenosinmoleküls aufweisen.



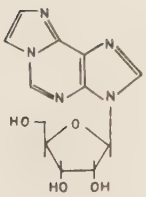
Adenosin (Ad)



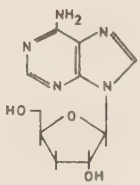
2-Fluoro-Ad



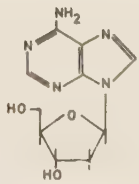
7-Deaza-Ad



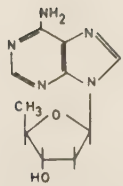
1,N^6-Etheno-Ad



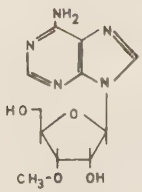
3'-Deoxy-Ad



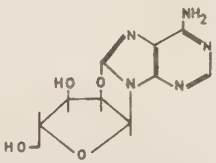
2'-Deoxy-Ad



2',5'-Dideoxy-Ad



3'-O-Methyl-Ad



8,2'-O-Cyclo-Ad

Abb. 18: Strukturformeln von Adenosin (Ad) und verschiedenartig substituierten Adenosinderivaten.

8,2'-O-Cycloadenosin kann als ein innerer Äther des Adenosins angesehen werden, dessen räumliche Struktur durch die Art der Verknüpfung fixiert wird.

3.1.2.1. Einfluß auf den durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt

Abbildung 19 zeigt die Wirkung von 2',5'-Dideoxyadenosin und Adenosin auf den durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen. Bei einer Konzentration von 10^{-7}M konnte Adenosin den Noradrenalin-Effekt nahezu vollständig unterdrücken, während 2',5'-Dideoxyadenosin erst bei einer 1000-fach höheren Konzentration gleichermaßen inhibitorisch wirksam wurde.

Mit Ausnahme von 2-Fluoroadenosin waren die untersuchten Derivate wesentlich schwächer wirksam als Adenosin. Tabelle 3 (linke Spalte) zeigt die IC_{50}-Werte von Adenosin und den verschiedenartig substituierten Adenosinderivaten bei maximaler Erhöhung des cAMP-Gehalts isolierter Fettzellen durch 1 µM Noradrenalin. 2-Fluoroadenosin war 1,6-fach stärker wirksam als Adenosin. Bis zu einer Konzentration von 0,1 mM zeigten 1,N^6-Ethenoadenosin sowie 8,2'-O-Cycloadenosin keine inhibitorische Wirkung und wurden damit als inaktiv eingestuft. Höhere Nukleosidkonzentrationen als 0,1 mM wurden in Untersuchungen an isolierten Fettzellen nicht verwendet. Einige Derivate standen nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung, so daß deshalb Untersuchungen bei höheren Konzentrationen nicht durchgeführt wurden. Die übrigen Derivate waren 50- bis 2500-fach schwächer wirksam als Adenosin.

Die zwar geringe, aber doch meßbare Wirksamkeit der meisten Derivate könnte allerdings auch durch geringe Verunreinigungen mit Adenosin bedingt sein. Das würde bedeuten, daß die Derivate per se inaktiv sein könnten, während der geringe

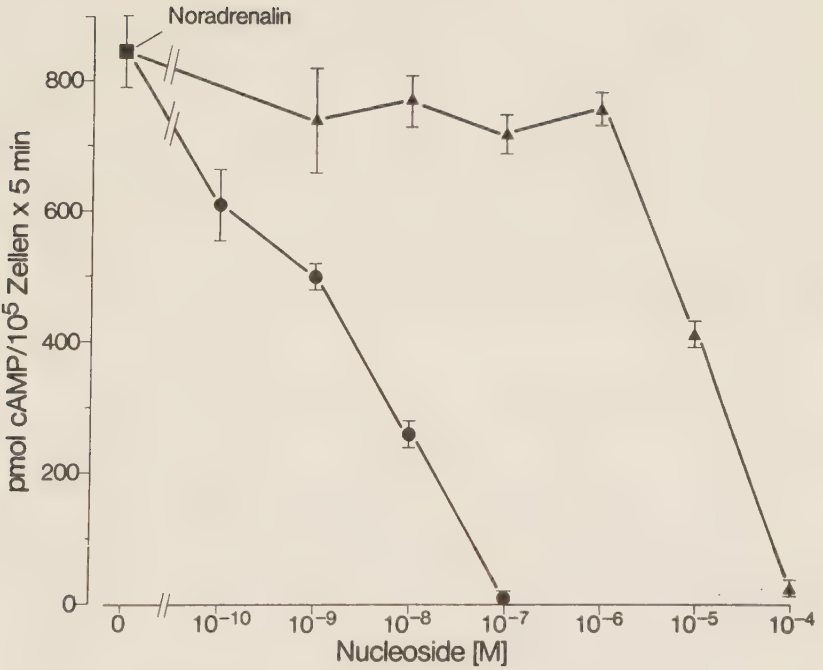


Abb. 19: Wirkung von 2',5'-Dideoxyadenosin (▲—▲) und Adenosin (●—●) auf den durch (-)-Noradrenalin (1 µM) erhöhten cAMP-Gehalt von isolierten Rattenfettzellen. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3-4) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Zellpräparation. Der Basalwert (nicht gezeigt) in Abwesenheit der Nukleoside betrug 10,3 ± 6,0 pmol cAMP/10^5 Zellen x 5 min (n = 4). Rechteckiges Symbol: cAMP-Gehalt in Gegenwart von 1 µM (-)-Noradrenalin.

Tabelle 3:

IC_{50}-Werte von Adenosin (Ad) und verschiedenartig substituierten Adenosinderivaten. Linke Spalte: IC_{50}-Werte bei maximaler Erhöhung des cAMP-Gehalts von isolierten Rattenfettzellen durch (-)-Noradrenalin (NOR; 1 µM). Rechte Spalte: IC_{50}-Werte bei submaximaler Stimulation der Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen durch Theophyllin (THEO; 0,1 mM). Einzelheiten s. Methodik. IC_{50}-Werte werden als negative Logarithmen derjenigen molaren Nukleosidkonzentrationen angegeben, die eine 50 %-ige Hemmung der stimulierten Bezugswerte bewirken. Die Werte für die Adenosinderivate stammen aus 1 - 2 verschiedenen Konzentrations-Wirkungskurven mit jeweils 2 - 4 Einzelinkubaten für jede Konzentration; die Werte für Adenosin sind Mittelwerte aus 4 - 6 verschiedenen Kurven. P_{REL}: relative Wirkungsstärke bezogen auf Adenosin. inaktiv:keine Hemmung bis 0,1 mM.

Nukleoside	cAMP (NOR; 1 µM)		Lipolyse (THEO; 0,1 mM)	
	IC_{50}	P_{REL}	IC_{50}	P_{REL}
ADENOSIN (Ad)	8,1	1,0	6,9	1,0
2-Fluoro-Ad	8,3	1,6	7,5	4,0
7-Deaza-Ad	5,5	0,003	4,5	0,004
1,N^6-Etheno-Ad	inaktiv		inaktiv	
3'-Deoxy-Ad	6,4	0,02	5,2	0,02
2'-Deoxy-Ad (Sigma)	6,0	0,008	4,6	0,005
2'-Deoxy-Ad (Boehr.)	4,7	0,0004	inaktiv	
2',5'-Dideoxy-Ad	5,0	0,0008	inaktiv	
3'-O-Methyl-Ad	5,0	0,0008	inaktiv	
8,2'-O-Cyclo-Ad	inaktiv		inaktiv	

Gehalt an Adenosin eine inhibitorische Wirkung vortäuscht. Dieses Problem könnte gelöst werden, wenn die Derivate in Gegenwart von Adenosindesaminase untersucht würden. Es ist jedoch bekannt, daß z.B. 2'-Deoxyadenosin oder 3'-Deoxyadenosin durch das Enzym sehr rasch abgebaut werden können (Agarwal et al., 1975). Das Verhalten der übrigen Derivate gegenüber Adenosindesaminase war z.T. nicht bekannt. Daher wurden Untersuchungen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Bei diesem Verfahren waren Adenosinverunreinigungen von ca. 1 % noch gut sichtbar. Durch die Nachweisgrenze kamen für eine Untersuchung allerdings nur die Derivate in Frage, die bis zu 100-fach schwächer wirksam waren als Adenosin.

2'-Deoxyadenosin der Fa. Sigma war ungefähr 100-fach schwächer wirksam als Adenosin, d.h. möglich wäre eine 1 %-ige Verunreinigung des Derivats mit Adenosin. In der chromatographischen Untersuchung von 2'-Deoxyadenosin (R_f-Wert: 0,27) konnte kein Adenosin (R_f-Wert: 0,16) nachgewiesen werden. Mit einer Lösung des Derivats, der absichtlich 1 % Adenosin zugesetzt worden war, gelang hingegen eine gute Auftrennung der beiden Nukleoside, wobei der Adenosinfleck noch deutlich sichtbar war. Andere Flecken wurden nicht gesehen. Erst nach diesen Untersuchungen war 2'-Deoxyadenosin der Fa. Boehringer verfügbar, das 20-fach schwächer wirksam war als das von der Fa. Sigma vertriebene Derivat. Dieses Ergebnis weist allerdings darauf hin, daß die Derivate Verunreinigungen enthalten können, die zwar wie Adenosin antilipolytisch wirksam sind, durch die verwendete chromatographische Untersuchung jedoch nicht sichtbar gemacht werden konnten. In chromatographischen Untersuchungen von 3'-Deoxyadenosin (R_f-Wert: 0,29), das nur 50-fach schwächer wirksam war als das natürliche Nukleosid, konnten keine Verunreinigungen nachgewiesen werden.

3.1.2.2. Einfluß auf die durch Theophyllin stimulierte Lipolyse

Die N^6-substituierten Derivate bildeten auf Grund ihrer unterschiedlichen inhibitorischen Wirksamkeit eine bestimmte Reihenfolge, die auch bei Verwendung verschiedener lipolytischer Stimulatoren weitgehend reproduzierbar war (s. Tab.1 und 2). So wurden die verschiedenartig substituierten Adenosinderivate nur in ihrer Wirkung auf die durch Theophyllin stimulierte Lipolyse untersucht.

Zur Hemmung der durch 1 mM Theophyllin maximal stimulierten Lipolyse waren jedoch ungefähr 100-fach höhere Adenosinkonzentrationen (IC_{50}= 5,9) erforderlich als zur Hemmung der Noradrenalinwirkung auf den cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen (IC_{50}= 8,1), d.h.: Ein Nukleosid, das z.B. 1000-fach schwächer als Adenosin wirksam ist und bis zu einer Konzentration von 0,1 mM untersucht werden soll, zeigt noch eine vollständige Hemmung erhöhter cAMP-Spiegel, während die inhibitorische Wirkung desselben Nukleosids auf die Theophyllin-Lipolyse nicht mehr sichtbar wird.

Die Hemmung der Theophyllin-Lipolyse durch Adenosin ist jedoch kompetitiv. Wird also die Konzentration des Theophyllins reduziert, so verschiebt sich die Konzentrationswirkungskurve des Adenosins nach links, d.h. geringere Adenosinkonzentrationen sind bereits inhibitorisch wirksam.

Tabelle 4 zeigt die IC_{50}-Werte von Adenosin bei maximaler und submaximaler Stimulation der Lipolyse isolierter Fettzellen durch Theophyllin. Bei maximaler Stimulation (1 mM Theophyllin) ergab sich in diesen Versuchen für Adenosin ein IC_{50}-Wert von 5,4. Bei submaximaler Stimulation (0,1 mM Theophyllin) ergab sich hingegen ein IC_{50}-Wert von 6,8, d.h. eine 50 %ige Hemmung der Lipolyse trat bereits bei einer 25-fach geringeren Adenosinkonzentration auf. In ähnlicher Weise änderten sich die IC_{50}-Werte von 2-Fluoroadenosin. Im Vergleich zu Adenosin war das Derivat sowohl bei maximaler als auch

Tabelle 4:

IC_{50}-Werte von Adenosin (Ad) und 2-Fluoro-Ad. Linke Spalte: IC_{50}-Werte bei maximaler Stimulation der Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen durch Theophyllin (THEO; 1 mM). Rechte Spalte: IC_{50}-Werte bei submaximaler Stimulation der Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen durch Theophyllin (THEO; 0,1 mM). Einzelheiten s. Methodik. IC_{50}-Werte werden als negative Logarithmen derjenigen molaren Nukleosidkonzentrationen angegeben, die eine 50 %-ige Hemmung der stimulierten Bezugswerte bewirken. Die Werte stammen aus 1 - 2 verschiedenen Konzentrations-Wirkungskurven mit jeweils 3 Einzelinkubaten für jede Konzentration. P_{REL}: relative Wirkungsstärke bezogen auf Adenosin.

Nukleoside	Lipolyse (THEO; 1 mM)		Lipolyse (THEO; 0,1 mM)	
	IC_{50}	P_{REL}	IC_{50}	P_{REL}
2-Fluoro-Ad	6,0	4,0	7,5	5,0
ADENOSIN (Ad)	5,4	1,0	6,8	1,0

bei submaximaler Stimulation 4- bis 5-fach stärker wirksam, d.h. während sich bei unterschiedlichen Theophyllinkonzentrationen die IC_{50}-Werte der Nukleoside erheblich änderten, blieben die P_{REL}-Werte annähernd gleich.

Um möglichst vollständige Konzentrations-Wirkungskurven der sehr schwach wirksamen Derivate zu erhalten, wurden die Nukleoside bei submaximaler Stimulation der Lipolyse durch 0,1 mM Theophyllin untersucht.

Abbildung 20 zeigt die Wirkung von 7-Deazaadenosin und Adenosin auf die durch 0,1 mM Theophyllin submaximal stimulierte Lipolyse isolierter Fettzellen. Bei maximaler Stimulation der Lipolyse durch Theophyllin hatte 7-Deazaadenosin bis zu einer Konzentration von 0,1 mM keinen Effekt. Dagegen trat - wie in der Abbildung gezeigt - bei submaximal wirksamer Theophyllinkonzentration die inhibitorische Wirkung des Derivats nahezu vollständig ein.

Tabelle 3 (rechte Spalte) zeigt die IC_{50}-Werte von Adenosin und den verschiedenartig substituierten Adenosinderivaten bei submaximaler Stimulation der Lipolyse isolierter Fettzellen durch 0,1 mM Theophyllin. Für Adenosin ergab sich ein mittlerer IC_{50}-Wert von 6,9; das entspricht einer Konzentration von $1,3 \times 10^{-7}$M. Vergleicht man die P_{REL}-Werte der linken (cAMP) und der rechten (Lipolyse) Spalte in der Tabelle, so war 2-Fluoroadenosin wiederum das einzige Nukleosid, das stärker als Adenosin wirksam war. Für 7-Deazaadenosin, 3'-Deoxyadenosin und 2'-Deoxyadenosin (Sigma) ergaben sich ähnliche P_{REL}-Werte: In beiden Untersuchungen waren die Derivate schwächer wirksam als Adenosin. Trotz Reduktion der Konzentration von Theophyllin auf 0,1 mM zeigten 2'-Deoxyadenosin (Boehringer), 2',5'-Dideoxyadenosin sowie 3'-O-Methyladenosin, für die in der linken Spalte noch ein IC_{50}-Wert angegeben wurde, bis zu einer Konzentration von 0,1 mM keinen nennenswerten inhibitorischen Einfluß auf die Lipolyse, so daß diese Derivate unter den gegebenen Bedingungen als inaktiv eingestuft wurden.

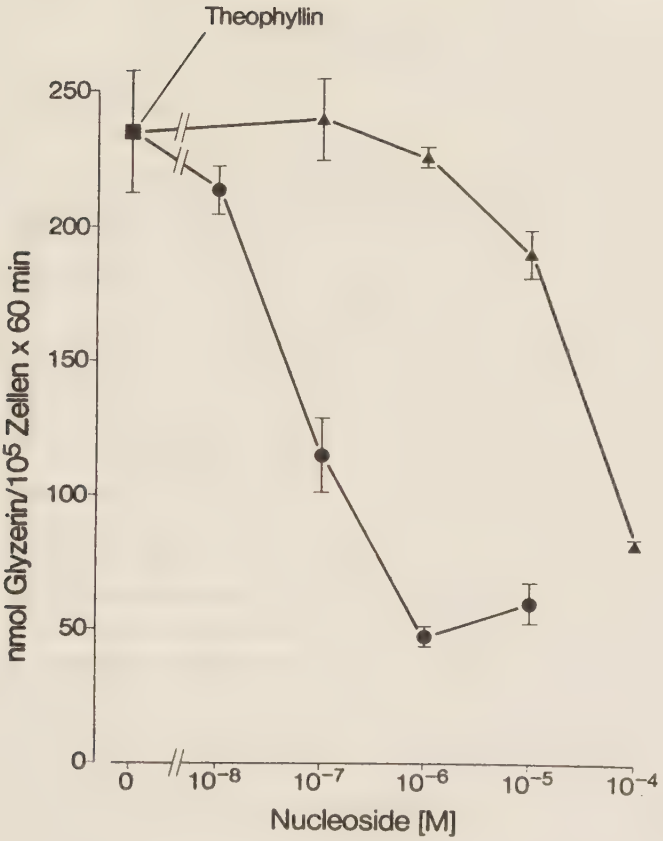


Abb. 20: Wirkung von 7-Deazaadenosin (▲—▲) und Adenosin (●—●) auf die durch Theophyllin (0,1 mM) submaximal stimulierte Lipolyse von isolierten Rattenfettzellen. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Zellpräparation. Der Basalwert (nicht gezeigt) in Abwesenheit der Nukleoside betrug 50,7 ± 0,6 nmol Glyzerin/10^5 Zellen x 60 min (n = 3). Rechteckiges Symbol: Lipolyse nach Stimulation durch 0,1 mM Theophyllin.

Die basale Lipolyse wurde durch die untersuchten Derivate nicht beeinflußt.

3.2. Versuche mit Plasmamembranen der Fettzelle

Das Enzym Adenylatzyklase ist ein integraler Bestandteil von Plasmamembranen kernhaltiger Zellen und katalysiert die Umsetzung von ATP zu cAMP (Übersicht bei Birnbaumer, 1977). Die Aktivität des Enzyms kann durch Hormone oder Neurotransmitter stimuliert werden, die über Rezeptoren an der Außenseite der Plasmamembran wirksam werden. Daneben existiert eine Reihe unterschiedlicher Substanzen, die ebenfalls eine Erhöhung der Enzymaktivität bewirken können, wie z.B. Guanylnukleotide oder Fluorid-Ionen. Im Gegensatz zu den Hormonen oder Neurotransmittern scheinen diese Substanzen ihre Wirkung auf die Adenylatzyklase über spezifische Strukturen in der Plasmamembran oder eventuell am Enzym selbst zu vermitteln. Während Hormone und Neurotransmitter durch Erhöhung der Adenylatzyklaseaktivität im zellfreien System denjenigen Mechanismus reflektieren, der an intakten Zellen - mehr oder weniger direkt - zu einer Erhöhung der cAMP-Spiegel führt, ist die stimulatorische Wirkung der anderen Substanzen charakteristisch für das zellfreie System und vermutlich ein Ausdruck regulatorischer Vorgänge in der Plasmamembran. Die unterschiedlichen Angriffsorte von Stimulatoren der Adenylatzyklase können benutzt werden, um Rückschlüsse über die Wirkungsweise von Inhibitoren zu ziehen.

3.2.1. N^6-substituierte Adenosinderivate und verschiedenartig substituierte Adenosinderivate

Der Einfluß von Adenosin und Adenosinderivaten auf die basale und stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Fettzelle wurde untersucht. Verwendet wurden die gleichen Derivate wie in den Experimenten mit isolierten Zellen.

Die Strukturformeln dieser Nukleoside sind in den Abbildungen 2 und 18 gezeigt. Zur Aktivierung der Adenylatzyklase wurden Noradrenalin, 5'-Guanylylimidodiphosphat oder Natriumfluorid verwendet. Da die N^6-substituierten Adenosinderivate im zellfreien System einheitliche Eigenschaften zeigten, wurden die Ergebnisse von N^6-substituierten und verschiedenartig substituierten Adenosinderivaten zusammen dargestellt.

3.2.1.1. Einfluß auf die basale und die durch Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität

Bekanntermaßen ist die Aktivität von Enzymen temperaturabhängig. Berücksichtigt man die Untersuchungen anderer Autoren, so ist festzustellen, daß die Adenylatzyklaseaktivität meistens bei 30°C (z.B. Sahyoun et al., 1976) oder bei 37°C (z.B. Schwabe et al., 1974) gemessen wurde. Daher wurde in Vorversuchen der Einfluß unterschiedlicher Inkubationstemperaturen auf die Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen ermittelt.

Abbildung 21 zeigt die Beziehung zwischen eingesetzter Membranprotein-Konzentration und Adenylatzyklaseaktivität bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen. Die Inkubationszeit betrug 4 Minuten. Das Inkubationsvolumen betrug 200 µl, so daß in der Abbildung die Protein-Konzentration in µg/200 µl angegeben wurde. Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C (linke Hälfte) ergab sich eine lineare Beziehung zwischen Adenylatzyklaseaktivität und eingesetzter Membranprotein-Konzentration bis zu 15 µg Protein/200 µl. Das galt für die basale wie auch für die durch 100 µM Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität. Bei einer Inkubationstemperatur von 30°C (rechte Hälfte) wurde im Bereich von 5-20 µg Protein/200 µl ebenfalls eine lineare Beziehung zwischen eingesetzter Membranprotein-Konzentration und basaler sowie stimulierter Adenylatzyklaseaktivität gefunden, wobei jedoch ca. 1,5-fach höhere Enzymaktivitäten als bei 37°C verzeichnet wurden. Um im Bereich einer linearen Beziehung zu liegen, wurden in den folgenden

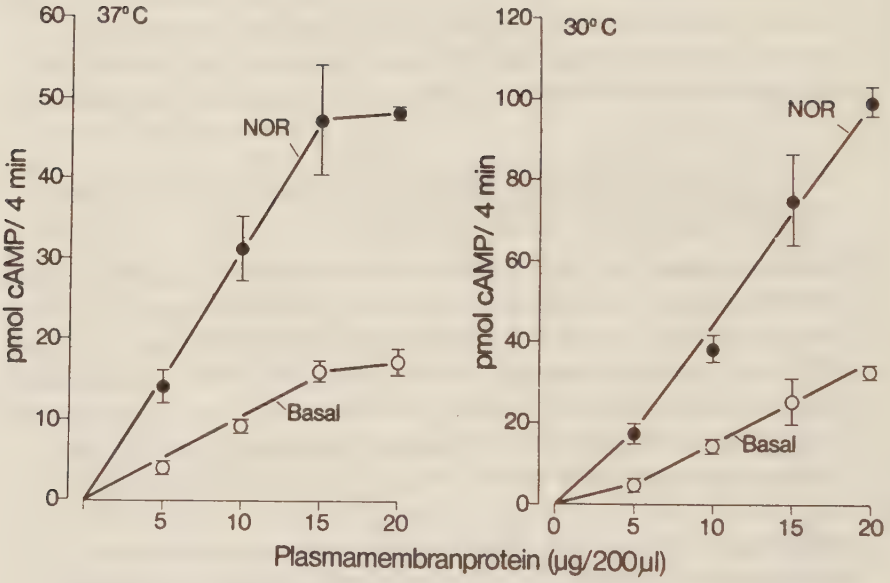


Abb. 21: Beziehung zwischen Protein-Konzentration von Plasmamembranen der Rattenfettzelle und Adenylatzyklaseaktivität bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur. Linke Hälfte: Inkubationstemperatur 37°C. Basale (offene Symbole) und durch (-)-Noradrenalin (NOR, 100 µM; geschlossene Symbole) stimulierte Adenylatzyklaseaktivität. Rechte Hälfte: Inkubationstemperatur 30°C. Basale (offene Symbole) und durch (-)-Noradrenalin (NOR, 100 µM; geschlossene Symbole) stimulierte Adenylatzyklaseaktivität. Die Plasmamembranen wurden 4 min unter Standardbedingungen inkubiert. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes. Die Plasmamembranen für beide Versuche stammen aus einer Membranpräparation.

Versuchen 6 - 12 µg Membranprotein in einem Endvolumen von 200 µl inkubiert. Zur Angabe der Enzymaktivität wurde auf 1 mg Protein umgerechnet.

Der Einfluß unterschiedlicher Temperaturen auf den zeitlichen Verlauf der basalen und stimulierten Adenylatzyklaseaktivität wird in Abbildung 22 gezeigt. Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C (linke Hälfte) wurde die Adenylatzyklase durch 100 µM Noradrenalin 6 Minuten lang annähernd konstant aktiviert, während die Basalaktivität nach einem anfänglich sprunghaften Anstieg im Zeitraum von 2 - 8 Minuten konstant blieb. Wiederum höhere Enzymaktivitäten wurden bei einer Inkubationstemperatur von 30°C erzielt (rechte Hälfte). Während die basale Aktivität nahezu verdoppelt wurde, zeigte das stimulierte Enzym eine ca. 1,5-fach höhere Aktivität als bei 37°C. In Gegenwart von 100 µM Noradrenalin wurde die Adenylatzyklase über 6 Minuten lang konstant aktiviert. Nach dieser Zeit wurde eine leichte Abnahme der stimulierten Enzymaktivität beobachtet. Die Basalaktivität des Enzyms blieb hingegen über den gesamten Zeitraum von 8 Minuten konstant. Auf Grund dieser Versuche wurde die Adenylatzyklaseaktivität bei einer Inkubationstemperatur von 30°C gemessen. Der Einfluß der Stimulatoren und Nukleoside wurde nach einer Inkubationszeit von 6 Minuten ermittelt, wobei zur Angabe der Aktivität auf 1 Minute umgerechnet wurde.

Abbildung 23 zeigt eine Konzentrations-Wirkungskurve von Noradrenalin auf die Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen. Der stimulatorische Effekt des Noradrenalins wurde bei einer Konzentration von 3×10^{-7}M deutlich sichtbar. Bei einer Konzentration von 10^{-4}M bewirkte Noradrenalin eine annähernd 4-fache Steigerung der basalen Enzymaktivität. Die dargestellte Kurve wurde aus 3 - 5 Einzelversuchen ermittelt, die im Laufe der Untersuchung wiederholt worden waren. In zwei anfänglich ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven trat ein maximaler Effekt des Noradrenalins bereits bei einer Konzentration von 10^{-5}M auf, so daß die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der

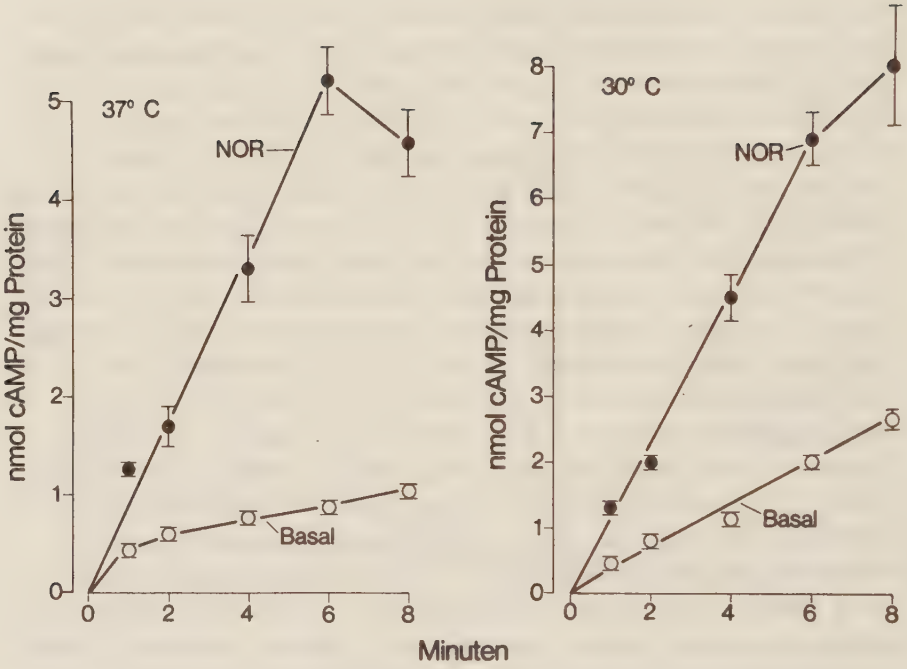


Abb. 22: Zeitlicher Verlauf der basalen (offene Symbole) und der durch (-)-Noradrenalin (NOR, 100 µM; geschlossene Symbole) stimulierten Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle bei unterschiedlicher Inkubationstemperatur. Linke Hälfte: Inkubationstemperatur 37°C. Rechte Hälfte: Inkubationstemperatur 30°C. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes. Die Plasmamembranen für beide Versuche stammen aus einer Membranpräparation.

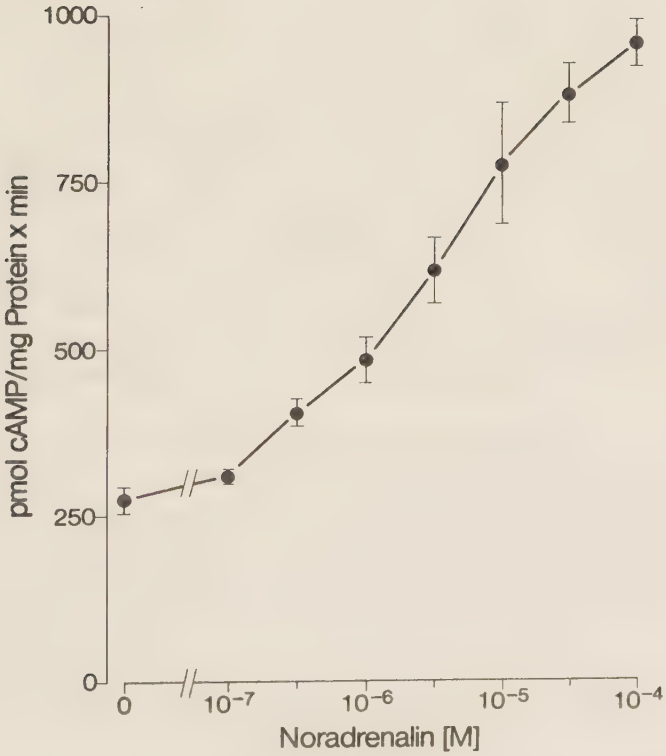


Abb. 23: Konzentrations-Wirkungskurve von (-)-Noradrenalin auf die Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3-5) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus 3 - 5 verschiedenen Versuchen mit jeweils 2 - 3 Einzelinkubaten für jede Konzentration.

Nukleoside bei einer Noradrenalinkonzentration von 10^{-5}M untersucht wurden.

Die Wirkung von Adenosin und N^6-Methyladenosin auf die basale und die durch 10 µM Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen wird in Abbildung 24 gezeigt. Adenosin hemmte sowohl die basale als auch die stimulierte Enzymaktivität konzentrationsabhängig. Die stimulierte Adenylatzyklaseaktivität wurde durch N^6-Methyladenosin bis zu einer Konzentration von 10^{-3}M nicht beeinflußt. Mit Ausnahme einer Konzentration von 10^{-6}M - bei dieser Konzentration wurde im vorliegenden Versuch eine leichte Abnahme der basalen Aktivität gefunden - zeigte N^6-Methyladenosin keinen inhibitorischen Einfluß auf die Basalaktivität der Adenylatzyklase. Der Effekt von 10^{-6}M N^6-Methyladenosin auf die Basalaktivität blieb eine Ausnahme; in weiteren Versuchen erwies sich das Derivat auch bei dieser Konzentration als unwirksam.

Selbst bei niedrigen Noradrenalin-Konzentrationen konnte ein inhibitorischer Effekt des Adenosinderivats nicht nachgewiesen werden (Abbildung 25). Während 0,1 mM Adenosin im gesamten Bereich der Konzentrations-Wirkungskurve von Noradrenalin auf die Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen einen ausgeprägten inhibitorischen Effekt zeigte, hatte die gleiche Konzentration von N^6-Methyladenosin keinerlei Einfluß: In Abwesenheit oder Gegenwart des Derivats ergab sich kein Unterschied im Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve.

Gleiche Ergebnisse wie mit N^6-Methyladenosin fanden sich auch mit den übrigen N^6-substituierten Adenosinderivaten, d.h. unabhängig von ihrer Wirksamkeit als Hemmstoffe des cAMP-Gehaltes und der Lipolyse isolierter Zellen erwiesen sich die untersuchten N^6-substituierten Adenosinderivate im zellfreien System ausnahmslos als inaktiv.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen an intakten Zellen war 2',5'-Dideoxyadenosin als Inhibitor der Adenylatzyklaseaktivität

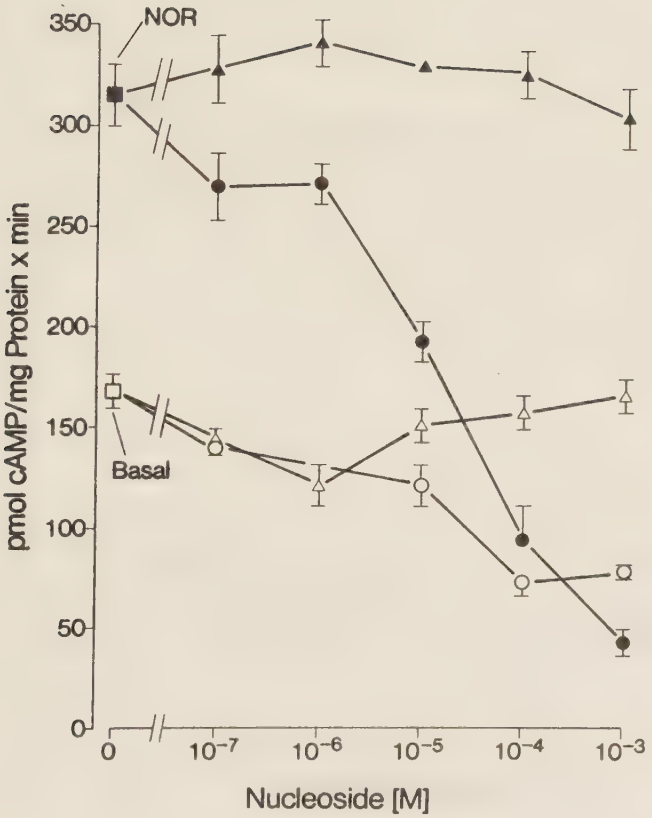


Abb. 24: Wirkung von Adenosin (○ / ●) und N^6-Methyladenosin (△ / ▲) auf die basale (offene Symbole) und die durch (-)-Noradrenalin (NOR, 10 µM; geschlossene Symbole) stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Membranpräparation. Rechteckige Symbole: Bezugswerte in Abwesenheit der Nukleoside.

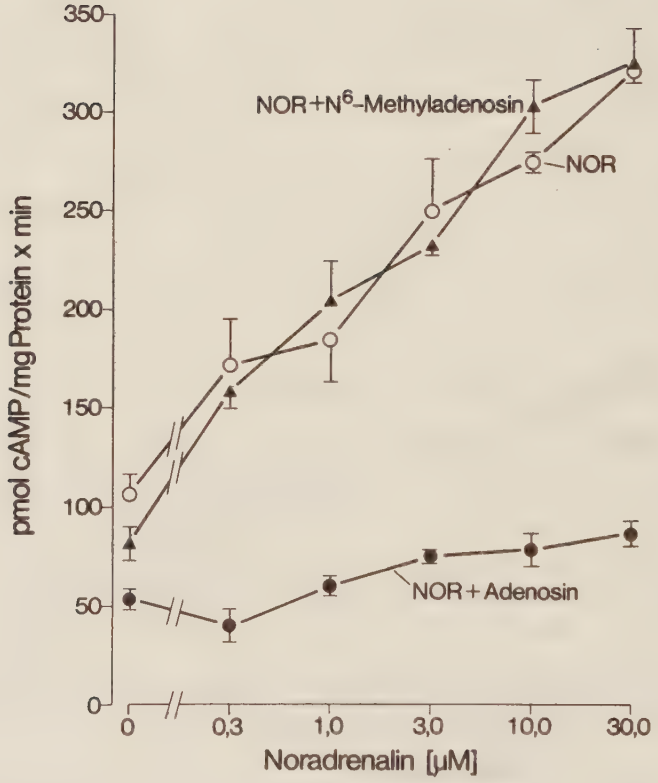


Abb. 25: Konzentrations-Wirkungskurven von (-)-Noradrenalin (NOR) auf die Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle in Abwesenheit von Nukleosiden (○—○), in Gegenwart von 0,1 mM N^6-Methyladenosin (▲—▲) und in Gegenwart von 0,1 mM Adenosin (●—●). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Membranpräparation.

von Plasmamembranen stärker wirksam als Adenosin. Abbildung 26 zeigt die Wirkung von Adenosin und 2',5'-Dideoxyadenosin auf die basale und die durch 10 µM Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen. Beide Nukleoside bewirkten eine konzentrationsabhängige und nahezu vollständige Hemmung der basalen und stimulierten Enzymaktivität.

Die IC_{50}-Werte von Adenosin und allen untersuchten Adenosinderivaten bei Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Fettzelle durch 10 µM Noradrenalin sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Da die Basalaktivität des Enzyms durch die inhibitorisch wirksamen Nukleoside gehemmt wurde, wurden die basalen Werte von den jeweils dazugehörigen stimulierten Werten subtrahiert, wodurch die "Nettoeffekte" der Nukleoside ermittelt wurden. Diese "Nettowerte" ergaben die Konzentrations-Wirkungskurven, aus denen die IC_{50}-Werte ermittelt wurden. Für Adenosin ergab sich demnach ein IC_{50}-Wert von 4,9, das entspricht einer Konzentration von $1{,}3 \times 10^{-5}$M. Neben 2-Fluoroadenosin waren alle Deoxyadenosin-Derivate stärker wirksam als Adenosin. An dieser Stelle sei insbesondere darauf hingewiesen, daß für 2'-Deoxyadenosin der Firma Sigma ein gleicher IC_{50}-Wert ermittelt wurde wie für das Derivat der Firma Boehringer, während die beiden Derivate als Hemmstoffe des durch Noradrenalin stimulierten cAMP-Gehalts isolierter Fettzellen unterschiedlich stark wirksam waren (s. Tab. 3). Alle übrigen Derivate waren bis zu einer Konzentration von 0,1 mM inaktiv.

3.2.1.2. Einfluß auf die basale und die durch Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität in Gegenwart von Adenosindesaminase

Zur Bestimmung der Adenylatzyklaseaktivität wird ATP benötigt. Aus ATP könnte durch membranständige ATPasen und Nukleotidasen während der Inkubation Adenosin entstehen, das die

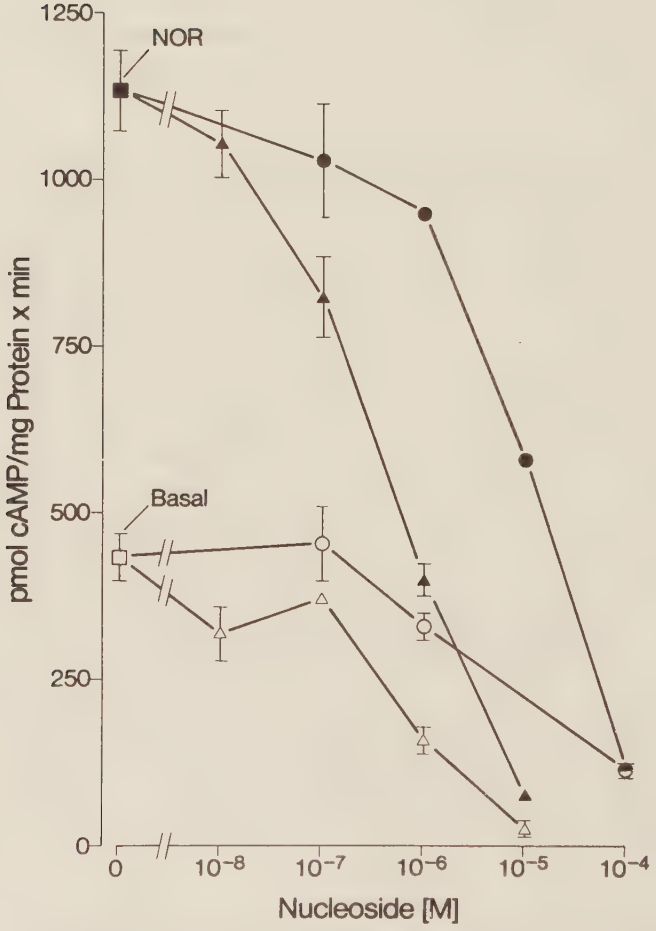


Abb. 26: Wirkung von Adenosin (○/●) und 2',5',-Dideoxyadenosin (△/▲) auf die basale (offene Symbole) und die durch (-)-Noradrenalin (NOR, 10 µM; geschlossene Symbole) stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 2-3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes für n = 3 und stammen aus einer Membranpräparation. Rechteckige Symbole: Bezugswerte in Abwesenheit der Nukleoside.

Tabelle 5:

IC_{50}-Werte von Adenosin (Ad) und Adenosinderivaten bei Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle durch (-)-Noradrenalin (NOR; 10 µM). Einzelheiten s. Methodik. IC_{50}-Werte werden als negative Logarithmen derjenigen molaren Nukleosidkonzentrationen angegeben, die eine 50 %-ige Hemmung der stimulierten Bezugswerte bewirken. Die Werte für die Ad-Derivate stammen aus 1 - 2 verschiedenen Konzentrations-Wirkungskurven mit jeweils 2 - 3 Einzelinkubaten für jede Konzentration; der Wert für Adenosin ist ein Mittelwert aus 8 verschiedenen Kurven. N^6-subst. Ad-Derivate sind die in Abbildung 2 aufgeführten Substanzen. P_{REL}: relative Wirkungsstärke bezogen auf Adenosin. inaktiv: keine Hemmung bis 0,1 mM.

Nukleoside	Adenylatzyklaseaktivität (NOR 10 µM)	
	IC_{50}	P_{REL}
ADENOSIN (Ad)	4,9	1,0
2-Fluoro-Ad	5,2	2,0
N^6-subst. Ad-Derivate	inaktiv	
7-Deaza-Ad	inaktiv	
1,N^6-Etheno-Ad	inaktiv	
3'-Deoxy-Ad	5,8	8,0
2'-Deoxy-Ad (Sigma)	5,2	2,0
2'-Deoxy-Ad (Boehr.)	5,2	2,0
2',5'-Dideoxy-Ad	6,5	40,0
3'-O-Methyl-Ad	inaktiv	
8,2'-O-Cyclo-Ad	inaktiv	

inhibitorische Wirkung der N^6-substituierten Derivate auf die Adenylatzyklase durchaus verdecken könnte. Um dieses Problem zu klären, wurden Versuche mit Adenosindesaminase durchgeführt.

Zunächst mußte bewiesen werden, daß das Enzym Adenosindesaminase auch unter den Bedingungen des zellfreien Systems aktiv war. Abbildung 27 zeigt den zeitlichen Verlauf der basalen und der durch 10 µM Noradrenalin stimulierten Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen, die mit und ohne Zusatz von Adenosindesaminase (1 µg/ml) inkubiert worden waren. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten wurde allen Inkubaten Adenosin zugesetzt (Pfeil), so daß eine Adenosinkonzentration von 0,1 mM erreicht wurde. In Gegenwart von Adenosindesaminase und auch nach Zusatz von Adenosin zeigten die basale und die stimulierte Adenylatzyklaseaktivität einen linearen Verlauf. Enthielten die Inkubate jedoch keine Adenosindesaminase, so wurde die Adenylatzyklaseaktivität sofort nach Zusatz von Adenosin stark vermindert. Aus diesem Versuch konnte geschlossen werden, daß Adenosindesaminase auch im zellfreien System und unter den gewählten Bedingungen wirksam war.

Ein signifikanter Einfluß der Adenosindesaminase (1 µg/ml) auf die basale oder auf die durch 10 µM Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Fettzelle konnte nicht nachgewiesen werden (Tabelle 6).

In Konzentrationen von 10^{-10} - 10^{-4}M zeigte N^6-Cyclohexyladenosin auch in Gegenwart von Adenosindesaminase (1 µg/ml) keinen inhibitorischen Einfluß auf die durch 10 µM Noradrenalin aktivierte Adenylatzyklase von Plasmamembranen der Fettzelle (Tabelle 7).

3.2.1.3. Einfluß auf die basale und die durch Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität in Gegenwart von Adenosin

Abbildung 28 zeigt die Wirkung von Adenosin auf die basale

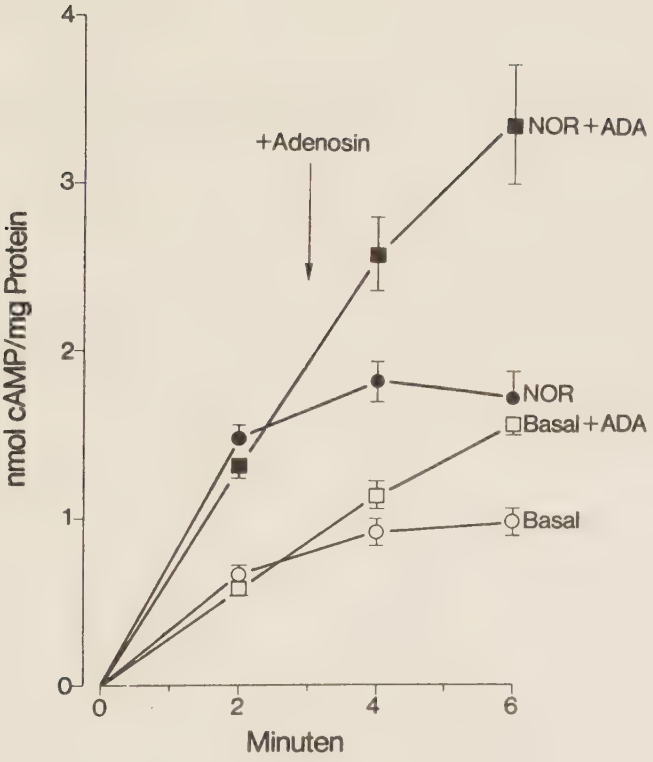


Abb. 27: Einfluß von Adenosin auf den zeitlichen Verlauf der basalen und stimulierten Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle, die mit und ohne Adenosindesaminase (ADA; 1 µg/ml) inkubiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 3 Min. wurde allen Inkubaten Adenosin (Endkonzentration 0,1 mM) zugesetzt (Pfeil). ○–○ Basal; □–□ Basal + ADA; ●–● (-)-Noradrenalin (NOR; 10 µM); ■–■ NOR (10 µM) + ADA (1 µg/ml). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Membranpräparation.

Tabelle 6:

Einfluß von Adenosindesaminase (ADA; 1 µg/ml) auf die basale und die durch (-)-Noradrenalin (NOR; 10 µM) stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 4) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus 4 verschiedenen Versuchen mit jeweils 2 - 4 Einzelinkubaten für jede Konzentration. Die Prüfung auf Signifikanz ($p < 0,05$) erfolgte nach Student's t-Test für verbundene Stichproben. N.S.: nicht signifikant ($p > 0,05$) gegenüber Aktivitäten ohne Zusatz von ADA. Basal: Basalaktivität in Abwesenheit von ADA und NOR.

	Adenylatzyklaseaktivität (pmol cAMP/mg Prot. x min)	
	ohne ADA	mit ADA
Basal	332,6 ± 35,1	354,7 ± 56,6 N.S.
NOR	745,1 ± 28,2	794,8 ± 51,4 N.S.

Tabelle 7:

Einfluß von N^6-Cyclohexyladenosin (N^6-Cyclohexyl-Ad) auf die durch Noradrenalin (NOR; 10 µM) in Gegenwart von Adenosindesaminase (ADA; 1 µg/ml) stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Membranpräparation.

	Adenylatzyklaseaktivität (pmol cAMP/mg Prot. x min)
ADA	301,6 ± 25,3
ADA + NOR	712,0 ± 26,0
ADA + NOR + N^6-Cyclohexyl-Ad 10^{-10} M	729,4 ± 27,8
" " " 10^{-8} M	702,8 ± 8,5
" " " 10^{-6} M	689,5 ± 24,0
" " " 10^{-5} M	747,6 ± 37,6
" " " 10^{-4} M	671,6 ± 40,4

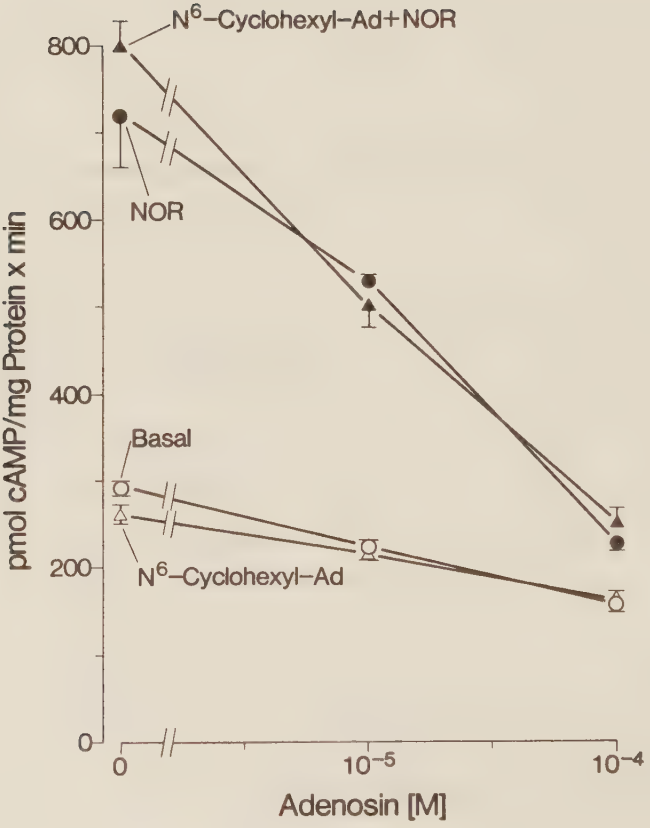


Abb. 28: Wirkung von Adenosin (Ad) auf die basale (offene Symbole) und die durch (-)-Noradrenalin (NOR, 10 µM; geschlossene Symbole) stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle in Abwesenheit (○/●) und Gegenwart (△/▲) von N^6-Cyclohexyladenosin (N^6-Cyclohexyl-Ad; 0,1 mM). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Membranpräparation.

und die durch 10 µM Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen. Der inhibitorische Effekt des Adenosins wurde in Gegenwart von 0,1 mM N^6-Cyclohexyladenosin nicht beeinflußt. In gleicher Weise wie in Abbildung 28 gezeigt und bei gleicher Konzentration (0,1 mM) wurden alle Nukleoside untersucht, die in Tabelle 5 als inaktiv eingestuft worden waren. Keines der N^6-substituierten Adenosinderivate oder der übrigen inaktiven Derivate konnte die inhibitorische Wirkung von Adenosin auf die basale oder die durch Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität beeinflussen.

3.2.1.4. Einfluß auf die durch 5'-Guanylylimidodiphosphat stimulierte Adenylatzyklaseaktivität

Der Effekt von 5'-Guanylylimidodiphosphat (GMP-PNP) auf die Adenylatzyklaseaktivität von Fettzellen ist durch eine inhibitorische und durch eine stimulatorische Phase gekennzeichnet (Ebert and Schwabe, 1974; Rodbell, 1975). Das Auftreten sowie der zeitliche Verlauf der inhibitorischen Phase ist im wesentlichen von der Inkubationstemperatur (Rodbell, 1975) und von der Konzentration des Guanylnukleotids (Ebert and Schwabe, 1974) abhängig.

Der Einfluß unterschiedlicher Temperaturen auf die in Gegenwart von 1 µM GMP-PNP inkubierte Adenylatzyklase von Plasmamembranen wurde untersucht. Abbildung 29 zeigt den Einfluß von GMP-PNP auf den zeitlichen Verlauf der Adenylatzyklaseaktivität bei einer Inkubationstemperatur von 30°C. 1 µM GMP-PNP führte initial zu einer Hemmung der Adenylatzyklaseaktivität. Nach einer Inkubationszeit von ungefähr 5 - 7 Minuten bewirkte GMP-PNP eine Erhöhung der Enzymaktivität, so daß die inhibitorische Phase nach 8 - 9 Minuten in eine stimulatorische Phase überging. Ein ausgeprägter stimulatorischer Effekt des GMP-PNP mit Werten, die deutlich höher lagen als die Basalwerte, konnte jedoch erst nach 12 Minuten beobachtet werden.

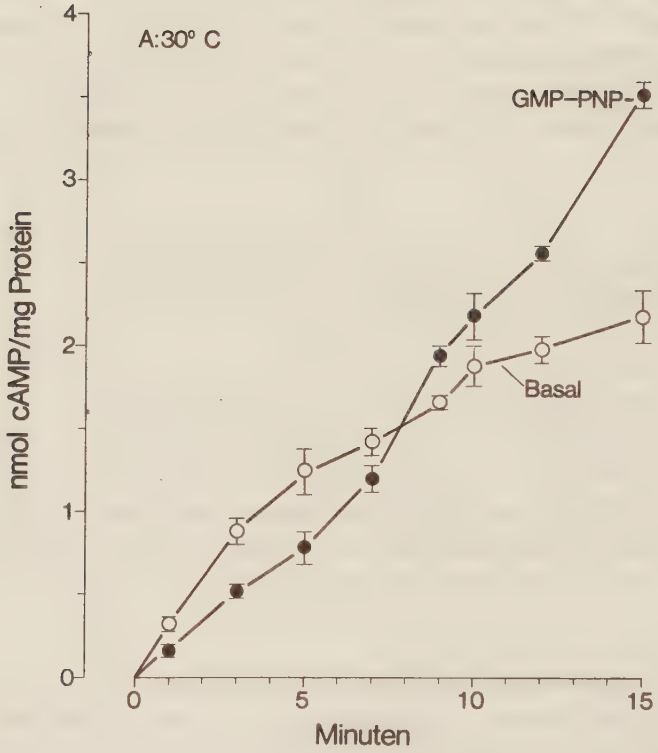


Abb. 29: Zeitlicher Verlauf der basalen (offene Symbole) und der durch 5'-Guanylylimidodiphosphat (GMP-PNP, 1 µM; geschlossene Symbole) stimulierten Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle bei einer Inkubationstemperatur von 30°C. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes. Die Plasmamembranen für diesen Versuch sowie für den Versuch in Abb. 30 stammen aus einer Membranpräparation.

Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37°C führte zu einer wesentlichen Verkürzung der initial inhibitorischen Wirkung von GMP-PNP (Abbildung 30). Bereits nach 1 Minute wurde die Adenylatzyklaseaktivität durch 1 µM GMP-PNP erhöht, so daß schon nach 3 Minuten deutlich höhere als basale Werte erreicht waren.

Auf Grund dieser Vorversuche wurde der Einfluß von GMP-PNP und/oder Nukleosiden auf die Adenylatzyklase bei einer Inkubationstemperatur von 37°C ermittelt. Die Wirkungen der Nukleoside auf die basale und die durch GMP-PNP stimulierte Adenylatzyklaseaktivität wurden nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten untersucht. Da unter diesen Bedingungen ein konstanter Verlauf der Adenylatzyklaseaktivität nicht gewährleistet war, wurde zur Angabe der Enzymaktivität auf 10 Minuten bezogen.

Abbildung 31 zeigt eine Konzentrations-Wirkungskurve von GMP-PNP auf die Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Fettzelle. Der stimulatorische Effekt des GMP-PNP wurde bei einer Konzentration von 10^{-7}M deutlich sichtbar und erreichte ein Maximum bei einer Konzentration von 3×10^{-5}M. Höhere Konzentrationen des Guanylnukleotids konnten die Enzymaktivität nicht weiter steigern. Zusatz von 0,1 mM Adenosin führte zu einer Hemmung der basalen und der durch GMP-PNP stimulierten Adenylatzyklaseaktivität. Im gesamten Bereich der Konzentrations-Wirkungskurve war Adenosin gleichermaßen inhibitorisch wirksam und bewirkte eine Reduktion aller Werte einschließlich des Basalwertes um durchschnittlich 40 %. Dieses Ergebnis deutet an, daß die inhibitorische Wirkung von Adenosin auf die durch GMP-PNP stimulierte Adenylatzyklaseaktivität auf einem nicht-kompetitiven Mechanismus beruht.

Die Wirkung von Adenosin und 2',5'-Dideoxyadenosin auf die basale und die durch 1 µM GMP-PNP stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Fettzelle wird in Abbildung 32 gezeigt. Beide Nukleoside bewirkten eine konzentrationsabhängige

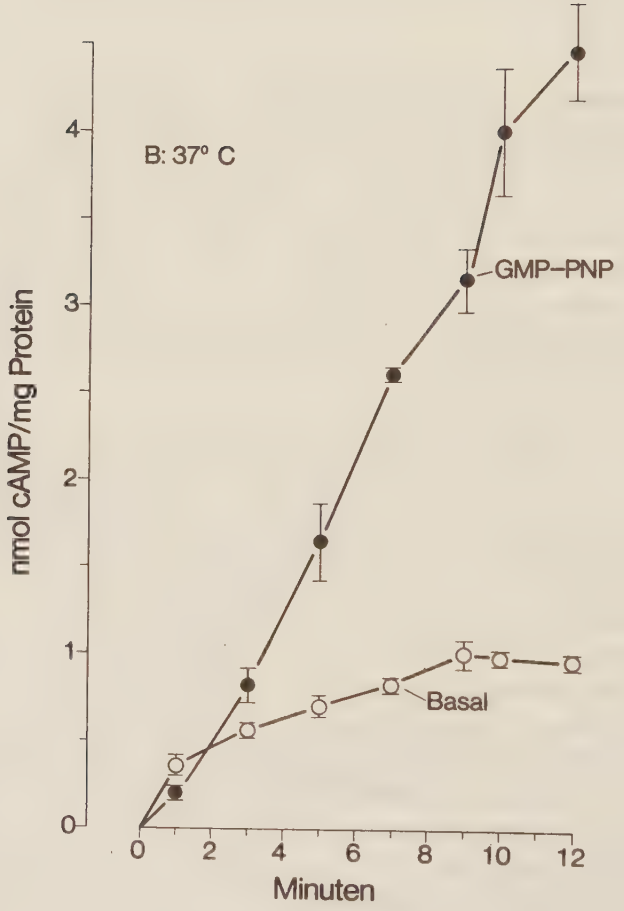


Abb. 30: Zeitlicher Verlauf der basalen (offene Symbole) und der durch 5'-Guanylylimidodiphosphat (GMP-PNP, 1 µM; geschlossene Symbole) stimulierten Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle bei einer Inkubationstemperatur von 37°C. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes. Die Plasmamembranen für diesen Versuch sowie für den Versuch in Abb. 29 stammen aus einer Membranpräparation.

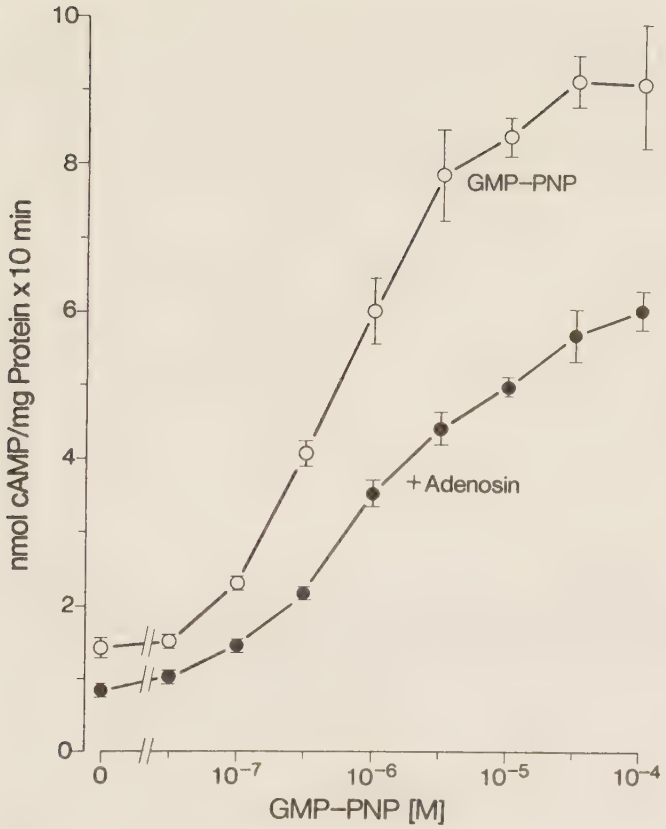


Abb. 31: Konzentrations-Wirkungskurven von 5'-Guanylyl-imidodiphosphat (GMP-PNP) auf die Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle in Abwesenheit (offene Symbole) und Gegenwart (geschlossene Symbole) von Adenosin (0,1 mM). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Membranpräparation.

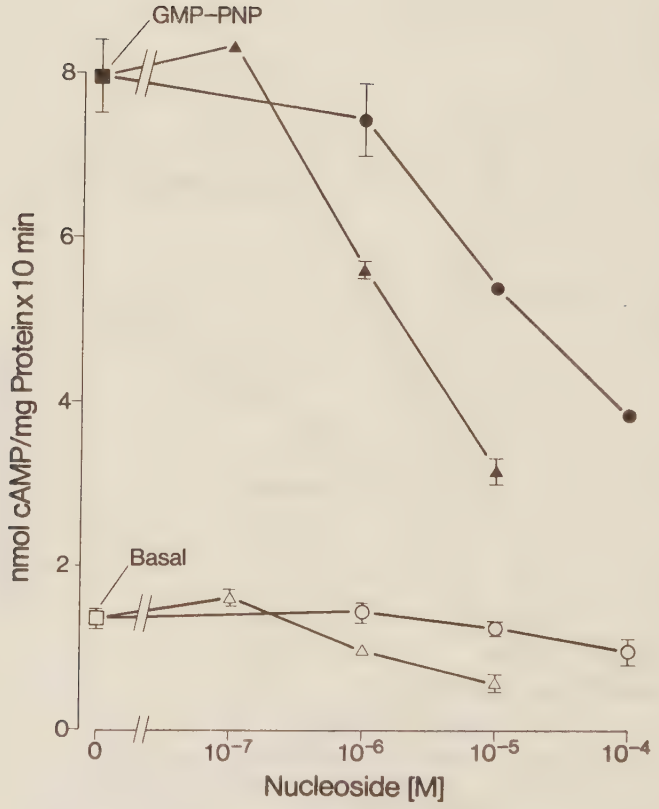


Abb. 32: Wirkung von Adenosin (○ / ●) und 2',5'-Dideoxyadenosin (△ / ▲) auf die basale (offene Symbole) und die durch 5'-Guanylylimidodiphosphat (GMP-PNP, 1 µM; geschlossene Symbole) stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 2-3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes für n = 3 und stammen aus einer Membranpräparation. Rechteckige Symbole: Bezugswerte in Abwesenheit der Nukleoside.

Hemmung der basalen und der stimulierten Enzymaktivität. Im Vergleich zu Adenosin war 2',5'-Dideoxyadenosin stärker wirksam.

Die IC_{50}-Werte von Adenosin und 2',5'-Dideoxyadenosin bei Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Fettzelle durch 1 µM GMP-PNP sind in Tabelle 8 aufgeführt. Für Adenosin ergab sich ein IC_{50}-Wert von 4,2, das entspricht einer Konzentration von $6,3 \times 10^{-5}$M. 2',5'-Dideoxyadenosin war 16-fach stärker wirksam als Adenosin.

Innerhalb Konzentrationen von 10^{-6}M - 10^{-4}M zeigte N^6-Methyladenosin keine inhibitorische Wirkung auf die durch 1 µM GMP-PNP aktivierte Adenylatzyklase. Bei einer Konzentration von 0,1 mM zeigten die übrigen N^6-substituierten Adenosinderivate auch keine Wirkung auf die durch 1 µM GMP-PNP aktivierte Adenylatzyklase. Die N^6-substituierten Adenosinderivate wurden daher als inaktiv bezeichnet (Tabelle 8).

Bei einer Konzentration von 0,1 mM hemmten 2-Fluoroadenosin, 2'-Deoxyadenosin und 3'-Deoxyadenosin die durch 0,5 µM GMP-PNP stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen (Tabelle 9). Der Effekt des GMP-PNP wurde durch Adenosin um ca. 44 %, durch 2-Fluoroadenosin um ca. 71 %, durch 3'-Deoxyadenosin um ca. 47 % reduziert.

Die übrigen in Tabelle 5 als inaktiv bezeichneten Derivate wurden nicht untersucht.

3.2.1.5. Einfluß auf die durch Natriumfluorid stimulierte Adenylatzyklaseaktivität

Neben den Guanylnukleotiden können auch Fluorid-Ionen eine Aktivierung der Adenylatzyklase bewirken. Der stimulatorische Effekt des Fluorids konnte an Adenylatzyklasepräparationen vieler verschiedener Gewebe demonstriert werden; der genaue

Tabelle 8:

IC_{50}-Werte von Adenosin (Ad) und 2',5'-Dideoxy-Ad bei Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle durch 5'-Guanylyimidodiphosphat (GMP-PNP; 1 µM). Einzelheiten s. Methodik. IC_{50}-Werte werden als negative Logarithmen derjenigen molaren Nukleosidkonzentrationen angegeben, die eine 50 %-ige Hemmung der stimulierten Bezugswerte bewirken. Die Werte für Adenosin und 2',5'-Dideoxy-Ad sind Mittelwerte (n = 2) und stammen aus 2 verschiedenen Konzentrations-Wirkungskurven mit jeweils 2 - 3 Einzelinkubaten für jede Konzentration. Die Angaben für die N^6-subst. Ad-Derivate - das sind die in Abbildung 2 aufgeführten Substanzen - stammen aus 2 Versuchen mit jeweils 3 Einzelinkubaten für jede Konzentration. P_{REL}: relative Wirkungsstärke bezogen auf Adenosin. inaktiv: keine Hemmung bei 0,1 mM.

Nukleoside	Adenylatzyklaseaktivität (GMP-PNP 1 µM)	
	IC_{50}	P_{REL}
ADENOSIN (Ad)	4,2	1,0
2',5'-Dideoxy-Ad	5,4	16,0
N^6-subst. Ad-Derivate	inaktiv	

Tabelle 9:

Wirkung von Adenosin (Ad) und verschiedenen Adenosinderivaten auf die durch 5'-Guanylylimidodiphosphat (GMP-PNP; 0,5 µM) stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamenbranen der Rattenfettzelle. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 2-3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes für n = 3 und stammen aus einer Membranpräparation. Die Basalaktivität in Abwesenheit von GMP-PNP und/oder Nukleosiden betrug 0,93 ± 0,06 nmol cAMP/mg Prot. x 10 min (n = 3).

	Adenylatzyklaseaktivität (nmol cAMP/mg Prot. x 10 min)	
		% Hemmung
GMP-PNP	4,05 ± 0,18	0 %
+ Adenosin (Ad) 0,1 mM	2,28 ± 0,22	43,7 %
+ 2-Fluoro-Ad 0,1 mM	1,19	70,6 %
+ 2'-Deoxy-Ad 0,1 mM	1,64 ± 0,01	59,5 %
+ 3'-Deoxy-Ad 0,1 mM	2,15 ± 0,18	46,9 %

Wirkungsmechanismus ist jedoch bis heute noch unbekannt (Manganiello and Vaughan, 1976; Übersicht bei Birnbaumer, 1977).

Abbildung 33 zeigt den zeitlichen Verlauf der basalen und der durch 3 mM Natriumfluorid maximal stimulierten Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Fettzelle bei einer Inkubationstemperatur von 30°C. Die Basalaktivität blieb über 8 Minuten lang konstant. Natriumfluorid führte zu einer sofort einsetzenden Erhöhung der Adenylatzyklaseaktivität, die über 8 Minuten lang konstant beibehalten wurde.

Der Einfluß von Natriumfluorid und/oder Nukleosiden auf die Adenylatzyklase wurde nach einer Inkubationszeit von 6 Minuten ermittelt. Zur Angabe der Enzymaktivität wurde auf 1 Minute umgerechnet. Alle Versuche mit Natriumfluorid wurden bei einer Inkubationstemperatur von 30°C durchgeführt.

Die konzentrationsabhängige Wirkung von Natriumfluorid auf die Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen wird in Abbildung 34 gezeigt. Die Adenylatzyklaseaktivität blieb bis zu einer Konzentration von 3×10^{-4}M Natriumfluorid unverändert im Bereich basaler Werte. Innerhalb Konzentrationen von 3×10^{-4}M - 3×10^{-3}M bewirkte Natriumfluorid einen steilen Anstieg der Adenylatzyklaseaktivität. 3×10^{-5}M Natriumfluorid waren maximal wirksam. Eine weitere Erhöhung der Konzentration von Natriumfluorid führte zu einem "Umkippen" der Konzentrations-Wirkungskurve, d.h. Natriumfluorid konnte bei höheren als maximal wirksamen Konzentrationen seinen eigenen stimulatorischen Effekt hemmen. In Gegenwart von 30 µM Adenosin wurde die basale und die durch Natriumfluorid stimulierte Adenylatzyklaseaktivität gehemmt. Der basale Wert und die durch Natriumfluorid bis zu einer Konzentration von 3×10^{-3}M stimulierten Werte wurden um durchschnittlich 43 % reduziert, so daß ein nicht-kompetitiver Hemmtyp vorzuliegen scheint.

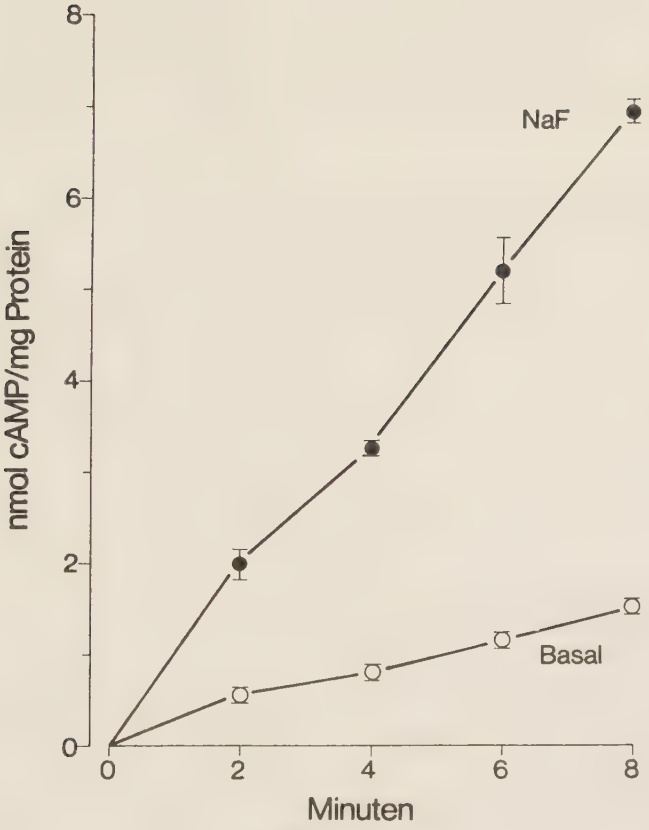


Abb. 33: Zeitlicher Verlauf der basalen (offene Symbole) und der durch Natriumfluorid (NaF, 3 mM; geschlossene Symbole) stimulierten Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Membranpräparation.

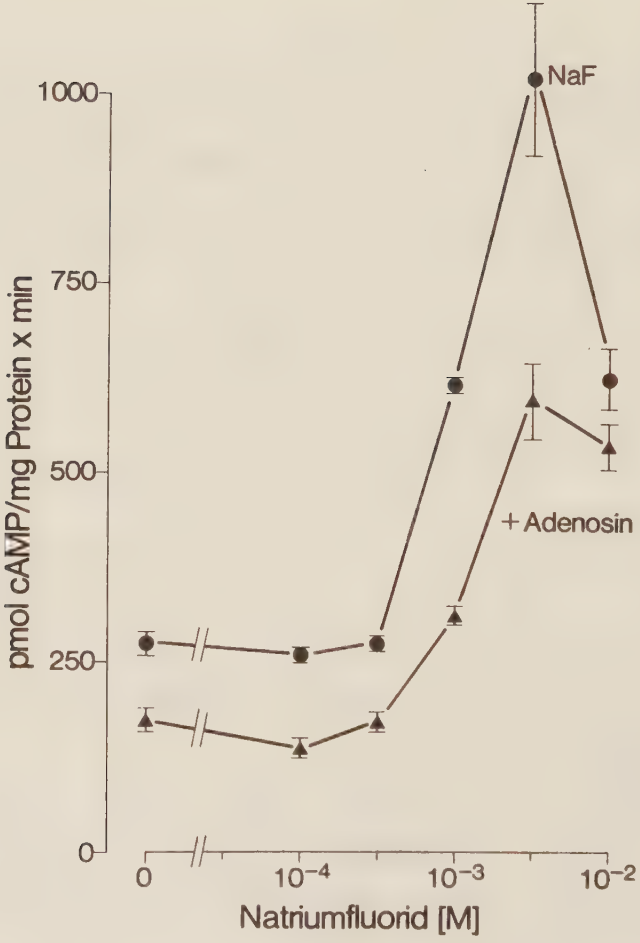


Abb. 34: Konzentrations-Wirkungskurven von Natriumfluorid (NaF) auf die Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle in Abwesenheit (●—●) und Gegenwart (▲—▲) von Adenosin (30 µM). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Membranpräparation.

Der Einfluß der Nukleoside auf die durch 3 mM Natriumfluorid maximal aktivierte Adenylatzyklase wurde untersucht. Adenosin und 2',5'-Dideoxyadenosin waren inhibitorisch wirksam. Abbildung 35 zeigt die konzentrationsabhängige Wirkung dieser beiden Nukleoside auf die durch Natriumfluorid (3 mM) stimulierte Adenylatzyklase. Wie in anderen Adenylatzyklase-versuchen war 2',5'-Dideoxyadenosin wieder stärker wirksam als Adenosin.

Bei maximaler Stimulation der Adenylatzyklase durch 3 mM Natriumfluorid ergab sich für Adenosin ein mittlerer IC_{50}-Wert von 4,0;entsprechend einer Konzentration von 10^{-4}M (Tabelle 10). Mit einem mittleren IC_{50}-Wert von 5,3 war 2',5'-Dideoxyadenosin 20-fach stärker wirksam als Adenosin.

Die N^6-substituierten Adenosinderivate wurden bei einer Konzentration von 0,1 mM untersucht und zeigten bei dieser Konzentration keinen inhibitorischen Einfluß auf die durch 3 mM Natriumfluorid aktivierte Adenylatzyklase. Sie wurden daher in Tabelle 10 als inaktiv eingestuft.

Hingegen waren 2-Fluoroadenosin, 2'-Deoxyadenosin sowie 3'-Deoxyadenosin bei einer Konzentration von 0,1 mM inhibitorisch wirksam auf die durch Natriumfluorid stimulierte Adenylatzyklase (Tabelle 11). Im vorliegenden Versuch wurde der stimulatorische Effekt von 3 mM Natriumfluorid durch Adenosin um ca. 65 %, durch 2-Fluoroadenosin um ca. 70 %, durch 2'-Deoxyadenosin um ca. 68 % und durch 3'-Deoxyadenosin um ca. 72 % gehemmt.

Die übrigen, in Tabelle 5 als inaktiv bezeichneten Derivate wurden nicht untersucht.

3.3. Einfluß von Theophyllin auf die basale und die durch Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Fettzelle und auf den durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen

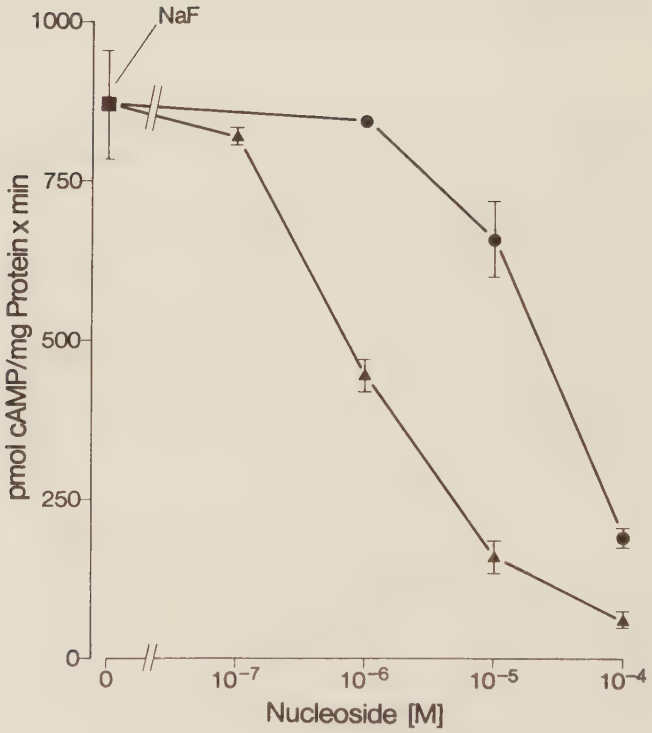


Abb. 35: Wirkung von Adenosin (●—●) und 2',5'-Dideoxyadenosin (▲—▲) auf die durch Natriumfluorid (NaF, 3 mM) stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 2-3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes für n = 3 und stammen aus einer Membranpräparation. Die Basalaktivität in Abwesenheit der Nukleoside (nicht gezeigt) betrug 380,8 ± 24,1 pmol cAMP/mg Protein x min (n = 3). Rechteckiges Symbol: Bezugswert in Abwesenheit der Nukleoside.

Tabelle 10:

IC_{50}-Werte von Adenosin (Ad) und 2',5'-Dideoxy-Ad bei Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle durch Natriumfluorid (NaF; 3 mM). Einzelheiten s. Methodik. IC_{50}-Werte werden als negative Logarithmen derjenigen molaren Nukleosidkonzentrationen angegeben, die eine 50 %-ige Hemmung der stimulierten Bezugswerte bewirken. Die Werte für Adenosin und 2',5'-Dideoxy-Ad sind Mittelwerte (n = 4) und stammen aus 4 verschiedenen Konzentrations-Wirkungskurven mit jeweils 3 Einzelinkubaten für jede Konzentration. Die Angaben für die N^6-subst. Ad-Derivate - das sind die in Abbildung 2 aufgeführten Substanzen - stammen aus 2 Versuchen mit jeweils 3 Einzelinkubaten für jede Konzentration. P_{REL}: relative Wirkungsstärke bezogen auf Adenosin. inaktiv: keine Hemmung bei 0,1 mM.

Nukleoside	Adenylatzyklaseaktivität (NaF; 3 mM)	
	IC_{50}	P_{REL}
ADENOSIN	4,0	1,0
2',5'-Dideoxy-Ad	5,3	20,0
N^6-subst. Ad-Derivate	inaktiv	

Tabelle 11:

Wirkung von Adenosin (Ad) und verschiedenen Adenosinderivaten auf die durch Natriumfluorid (NaF; 3,0 mM) stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 2-3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes für n = 3 und stammen aus einer Membranpräparation. Die Basalaktivität in Abwesenheit von NaF und/oder Nukleosiden betrug 114,9 ± 12,8 pmol cAMP/mg Prot. x min (n = 3).

	Adenylatzyklaseaktivität (pmol cAMP/mg Prot. x min)	
		% Hemmung
NaF	568,3 ± 30,2	0 %
+ Adenosin (Ad) 0,1 mM	198,2 ± 17,1	65,1 %
+ 2-Fluoro-Ad 0,1 mM	169,1	70,2 %
+ 2'-Deoxy-Ad 0,1 mM	180,9 ± 20,8	68,2 %
+ 3'-Deoxy-Ad 0,1 mM	156,6 ± 21,0	72,4 %

Theophyllin antagonisiert die Hemmwirkung von Adenosin auf den cAMP-Gehalt und die Lipolyse isolierter Fettzellen (Ebert and Schwabe, 1973; Schwabe and Ebert, 1974). Somit erhob sich die Frage, ob Theophyllin auch die Hemmwirkung des Adenosins auf die Adenylatzyklase von Plasmamembranen der Fettzelle antagonisieren kann.

Zunächst wurde die Wirkung von Theophyllin auf die basale und die durch 10 µM Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklase-aktivität untersucht (Abbildung 36). Bis zu einer Konzentration von 10^{-3}M Theophyllin blieb die basale als auch die durch Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität unbeeinflußt. Weitere Erhöhung der Konzentration von Theophyllin führte zu einer Hemmung der basalen und insbesondere der durch Noradrenalin stimulierten Enzymaktivität. Bei einer Konzentration von 10^{-2}M Theophyllin wurde die basale Aktivität um 21 % gehemmt, die durch 10 µM Noradrenalin stimulierte sogar um 44 %.

Abbildung 37 zeigt die Wirkung von Adenosin auf die basale und die durch 10 µM Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklase-aktivität von Plasmamembranen in Gegenwart und Abwesenheit von 3 mM Theophyllin. Der basale Ausgangswert wurde durch 3 mM Theophyllin nicht verändert, während der entsprechende stimulierte Wert durch 3 mM Theophyllin um 16 % gehemmt wurde. Die in Gegenwart von 10^{-4}M Adenosin gefundene basale Aktivität und die durch Noradrenalin stimulierte Aktivität wurden durch 3 mM Theophyllin leicht erhöht. Eine Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve des Adenosins oder ein signifikanter Einfluß von 3 mM Theophyllin auf den IC_{50}-Wert von Adenosin (Tabelle 12) wurde jedoch nicht gefunden.

Ein völlig anderes Ergebnis wurde an isolierten Fettzellen erhalten (Abbildung 38). Der durch 10 µM Noradrenalin erhöhte cAMP-Spiegel wurde durch 3 mM Theophyllin fast verdoppelt. Die Konzentrations-Wirkungskurve von Adenosin wurde in Gegenwart von 3 mM Theophyllin um annähernd 3 Größenordnungen

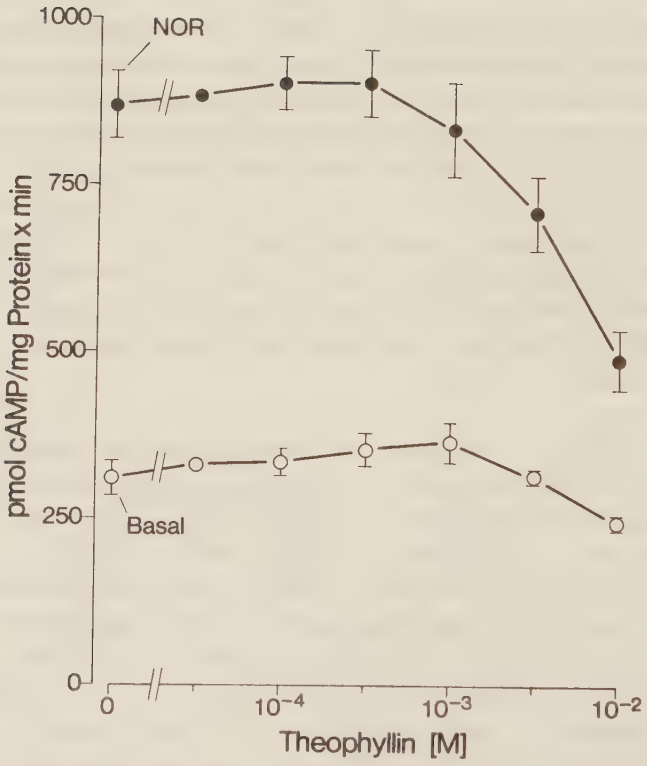


Abb. 36: Wirkung von Theophyllin auf die basale (offene Symbole) und die durch (-)-Noradrenalin (NOR, 10 µM; geschlossene Symbole) stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle. Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 2-7) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes für n = 2 und stammen aus 2 - 7 verschiedenen Versuchen mit jeweils 2 - 3 Einzelinkubaten für jede Konzentration.

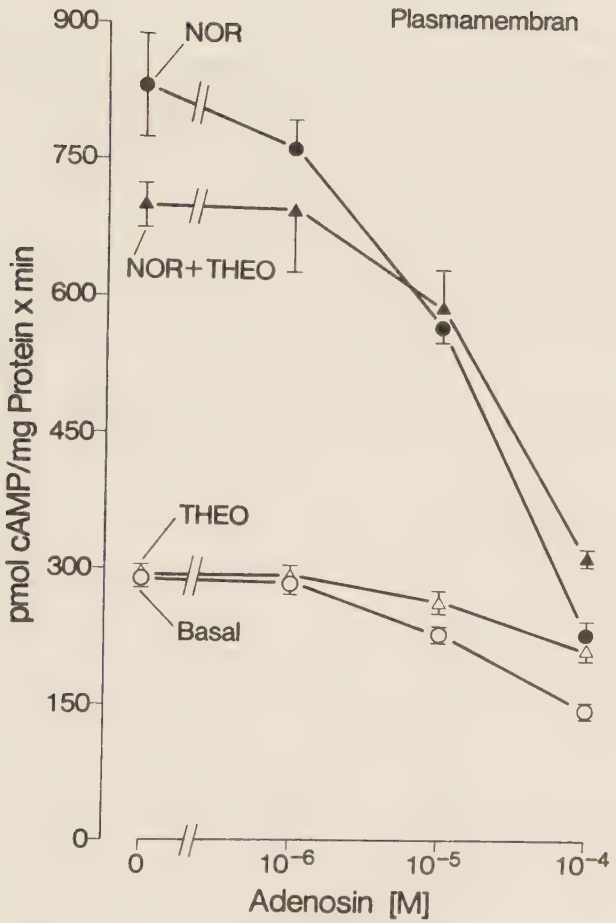


Abb. 37: Wirkung von Adenosin auf die basale (offene Symbole) und die durch (-)-Noradrenalin (NOR, 10 µM; geschlossene Symbole) stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle in Abwesenheit (○/●) und Gegenwart (△/▲) von Theophyllin (THEO, 3 mM). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 4) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus 4 verschiedenen Versuchen mit jeweils 2 - 3 Einzelinkubaten für jede Konzentration.

Tabelle 12:

Einfluß von Theophyllin (THEO; 3,0 mM) auf die IC_{50}-Werte von Adenosin (Ad) bei Erhöhung des cAMP-Gehalts von isolierten Rattenfettzellen durch (-)-Noradrenalin (10 µM) (linke Spalte) und bei Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle durch (-)-Noradrenalin (10 µM) (rechte Spalte). Einzelheiten s. Methodik. IC_{50}-Werte werden als negative Logarithmen derjenigen molaren Adenosinkonzentrationen angegeben, die eine 50 %-ige Hemmung der stimulierten Bezugswerte bewirken. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3-4) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus 3 - 4 verschiedenen Konzentrations-Wirkungs - kurven mit jeweils 2 - 3 Einzelinkubaten für jede Konzentration. Die Prüfung auf Signifikanz ($p < 0,05$) erfolgte nach Student's t-Test für verbundene Stichproben. S.: signifikant ($p < 0,001$) gegenüber Adenosin allein. N.S.: nicht signifikant ($p > 0,05$) gegenüber Adenosin allein.

	FETTZELLE	PLASMAMEMBRAN
	IC_{50}	IC_{50}
Adenosin (Ad)	7,99 ± 0,10	4,71 ± 0,08
Ad + THEO	5,47 ± 0,07 S.	4,52 ± 0,14 N.S.

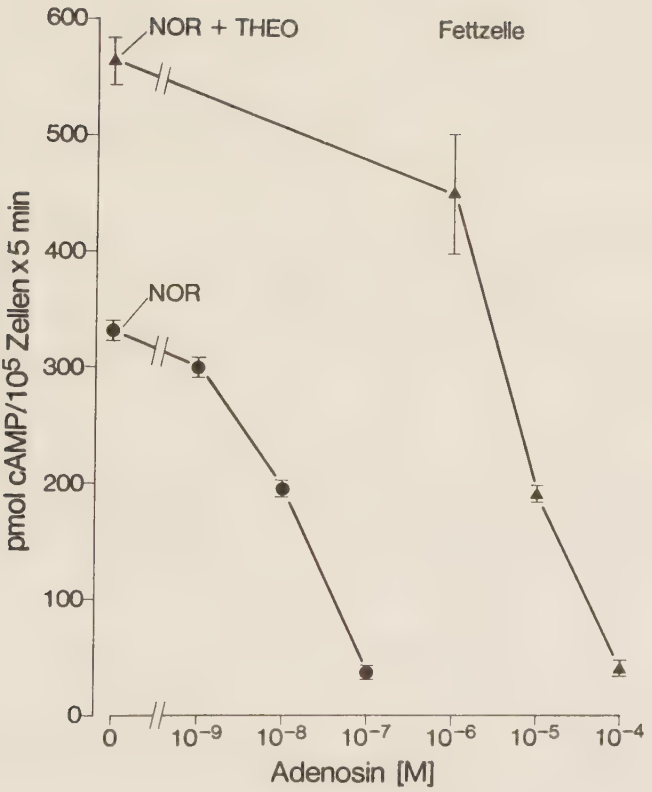


Abb. 38: Wirkung von Adenosin auf den durch (-)-Noradrenalin (NOR, 10 µM) erhöhten cAMP-Gehalt von isolierten Rattenfettzellen in Abwesenheit (●–●) und Gegenwart (▲–▲) von Theophyllin (THEO, 3 mM). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus einer Zellpräparation. Der Basalwert (nicht gezeigt) betrug 8,5 ± 3,1 pmol cAMP/10^5 Zellen x 5 min (n = 3). Der durch Theophyllin (3 mM) erhöhte cAMP-Gehalt (nicht gezeigt) betrug 36,6 ± 6,4 pmol cAMP/10^5 Zellen x 5 min (n = 3).

nach rechts verschoben.

Vergleicht man die in Abwesenheit und Gegenwart von 3 mM Theophyllin ermittelten IC_{50}-Werte von Adenosin (Tabelle 12), so ergab sich bei Erhöhung des cAMP-Gehalts von isolierten Fettzellen durch 10 µM Noradrenalin ein hochsignifikanter Unterschied zwischen beiden Werten, während bei Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen durch 10 µM Noradrenalin kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden IC_{50}-Werten gefunden wurde.

Der Einfluß steigender Konzentrationen von Theophyllin auf die durch 10 µM Adenosin hervorgerufene Hemmung der basalen und der durch 10 µM Noradrenalin aktivierten Adenylatzyklase wurde untersucht (Abbildung 39). Die basale Aktivität wurde durch 10 µM Adenosin von 297,9 $\pm$ 4,3 pmol cAMP/mg Protein x min (n = 3) auf 259,3 $\pm$ 23,3 pmol cAMP/mg Protein x min (n = 3) reduziert. Zusatz von Theophyllin ergab bis zu einer Konzentration von 3 x 10^{-3}M keine Änderung der basalen Aktivität, während bei einer Konzentration von 10^{-2}M Theophyllin eine leichte Hemmung der Basalaktivität eintrat (241,0 $\pm$ 4,4 pmol cAMP/mg Protein x min; n = 3).

Die durch 10 µM Adenosin gehemmte Aktivität wurde durch Theophyllin leicht erhöht. Bei einer Konzentration von 10^{-2}M Theophyllin wurde ein Wert von 292,9 $\pm$ 32,5 pmol cAMP/mg Protein x min (n = 3) gefunden. 10 µM Noradrenalin bewirkten eine Zunahme der Adenylatzyklaseaktivität um 556,4 pmol cAMP/mg Protein x min. Wie bereits in Abbildung 36 gezeigt, wurde die stimulierte Adenylatzyklase durch hohe Konzentrationen von Theophyllin (> 10^{-3}M) gehemmt. Bei einer Konzentration von 10^{-2}M Theophyllin wurde eine 44 %-ige Hemmung der durch Noradrenalin stimulierten Aktivität gefunden. Die durch Noradrenalin aktivierte Adenylatzyklase wurde durch 10 µM Adenosin von 854,3 $\pm$ 83,0 pmol cAMP/mg Protein x min (n = 3) auf 540,0 $\pm$ 21,4 pmol cAMP/mg Protein x min (n = 3) gehemmt. Theophyllin konnte die inhibitorische Wirkung des

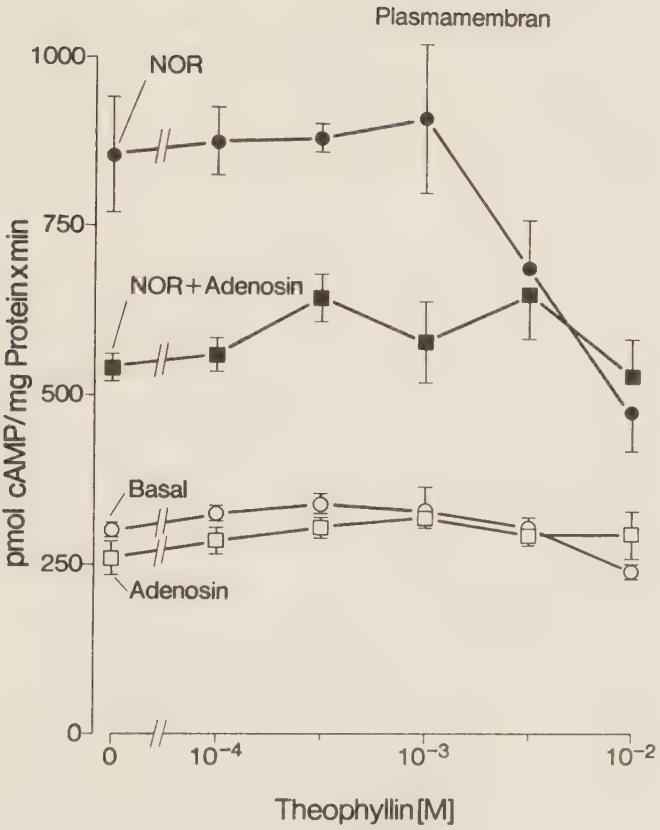


Abb. 39: Wirkung von Theophyllin auf die basale (offene Symbole) und die durch (-)-Noradrenalin (NOR, 10 µM; geschlossene Symbole) stimulierte Adenylatzyklase-aktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle in Abwesenheit (○ / ●) und Gegenwart (□ / ■) von Adenosin (10 µM). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus 3 verschiedenen Versuchen mit jeweils 2 - 3 Einzelinkubaten für jede Konzentration.

Adenosins jedoch nicht aufheben. Die in Gegenwart von Noradrenalin + Adenosin gefundene Adenylatzyklaseaktivität wurde zwar durch 3 x 10^{-4}M Theophyllin um 103 pmol cAMP/mg Protein x min erhöht, höhere Konzentrationen von Theophyllin führten jedoch nicht zu einer weiteren Steigerung der Adenylatzyklaseaktivität. Die in Gegenwart von 3 x 10^{-3}M oder 10^{-2}M Theophyllin + 10 µM Noradrenalin + 10 µM Adenosin gefundenen Aktivitäten unterschieden sich praktisch nicht von den entsprechenden Aktivitäten, die ohne Zusatz von Adenosin gefunden wurden.

Eine nahezu vollständige Aufhebung der inhibitorischen Wirkung des Adenosins durch Theophyllin konnte jedoch an isolierten Fettzellen erreicht werden (Abbildung 40). Gleiche Konzentrationen von Inhibitoren und Stimulatoren wie in den analogen Versuchen mit Plasmamembranen (s. Abbildung 39) wurden verwendet. Der durch 10 µM Noradrenalin hervorgerufene cAMP-Anstieg wurde durch Theophyllin bis zu einer Konzentration von 10^{-4}M gesteigert. Höhere Konzentrationen von Theophyllin brachten keine weiteren Veränderungen des cAMP-Gehalts. Der Effekt von 10 µM Noradrenalin auf den cAMP-Gehalt isolierter Zellen wurde durch 10 µM Adenosin fast vollständig unterdrückt. Zusatz von Theophyllin bewirkte jedoch eine konzentrationsabhängige Erhöhung des cAMP-Gehalts. Der Antagonismus von Theophyllin gegenüber der Wirkung von 10 µM Adenosin wurde bei einer Konzentration von 10^{-3}M Theophyllin sichtbar. Bei einer Konzentration von 10^{-2}M Theophyllin und in Gegenwart von 10 µM Noradrenalin + 10 µM Adenosin wurde ein cAMP-Gehalt von 383,6 $\pm$ 63,1 pmol cAMP/10^5 Zellen x 5 min (n = 3) gefunden. Dieser cAMP-Gehalt lag damit bereits weit über dem durch 10 µM Noradrenalin allein bedingten cAMP-Gehalt (218,5 $\pm$ 45,4 pmol cAMP/10^5 Zellen x 5 min; n = 6), aber noch unterhalb des cAMP-Gehalts, der durch 10 µM Noradrenalin + 10 mM Theophyllin hervorgerufen worden war (661,1 $\pm$ 130,2 pmol cAMP/10^5 Zellen x 5 min; n = 3).

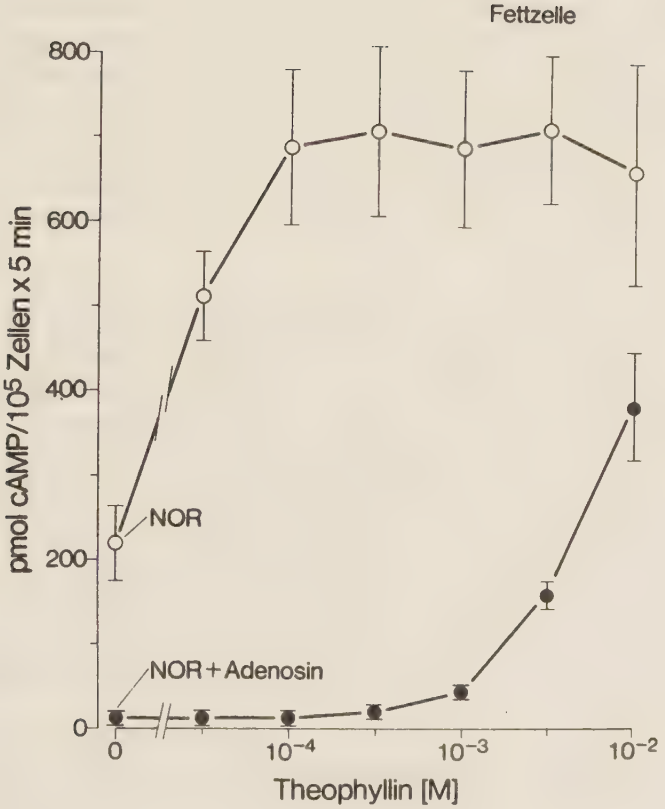


Abb. 40: Wirkung von Theophyllin auf den durch (-)-Noradrenalin (NOR, 10 µM) erhöhten cAMP-Gehalt von isolierten Rattenfettzellen in Abwesenheit (offene Symbole) und Gegenwart (geschlossene Symbole) von Adenosin (10 µM). Einzelheiten s. Methodik. Alle Werte sind Mittelwerte (n = 3-6) ± mittlerer Fehler des Mittelwertes und stammen aus 3 - 6 verschiedenen Zellpräparationen mit jeweils 2 - 3 Einzelinkubaten für jede Konzentration. Der Basalwert (nicht gezeigt) betrug 7,9 ± 3,1 pmol cAMP/10^5 Zellen x 5 min (n = 6).

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die inhibitorische Wirkung von Adenosin auf den cAMP-Gehalt und die Lipolyse isolierter Rattenfettzellen einerseits und auf die Adenylatzyklase von Plasmamembranen der Rattenfettzelle andererseits mit Hilfe verschiedener Adenosinderivate näher zu charakterisieren. Die Wirkung der Derivate auf die genannten Parameter wurde mit der des natürlichen Nukleosids verglichen. Dabei wurde gefunden, daß für Adenosin an intakten Fettzellen andere Struktur-Wirkungsbeziehungen gelten als an Plasmamembranen im zellfreien System.

An isolierten Fettzellen waren die N^6-monosubstituierten Adenosinderivate als Inhibitoren des cAMP-Gehalts und der Lipolyse entweder stärker oder schwächer wirksam als Adenosin. Definitionsgemäß waren also entweder geringere oder höhere Derivatkonzentrationen als Adenosinkonzentrationen erforderlich, um gleiche Wirkungen zu erzielen. Die durch Substitution eines H-Atoms in der N^6-Position des Moleküls hervorgerufene quantitative Änderung der Adenosinwirkung betraf den durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt gleichermaßen wie die durch Noradrenalin oder Theophyllin stimulierte Lipolyse: N^6-Cyclohexyladenosin, N^6-n-Propyladenosin und N^6-Phenyladenosin waren immer stärker wirksam als Adenosin, N^6-Methyladenosin, N^6-O-Xylyladenosin und N^6-Benzyladenosin waren hingegen immer schwächer wirksam als Adenosin. Die zur halbmaximalen Hemmung der Lipolyse oder des cAMP-Gehalts erforderlichen Konzentrationen (IC_{50}-Werte) N^6-substituierter Derivate einschließlich des Adenosins lagen größenordnungsmäßig innerhalb zweier Zehnerpotenzen. Ein gleicher Hemmbereich von zwei Zehnerpotenzen fand sich mit Ausnahme von N^6-Methyladenosin bei diesen Derivaten auch dann, wenn die Lipolyse durch Adenosinmangel (Inkubation in Gegenwart von Adenosindesaminase) ausgelöst wurde.

Die inhibitorische Wirkung N^6-monosubstituierter Adenosinderivate auf den cAMP-Gehalt und die Lipolyse isolierter

Rattenfettzellen ist bekannt (Butcher, 1971; Fain et al., 1972; Fain, 1973a; Ebert and Schwabe, 1973; Stock and Prilop, 1974; Schillinger and Loge, 1974; Fain and Wieser, 1975; Prilop, 1976; Fredholm, 1978). Fain (1973a) konnte bereits zeigen, daß N^6-Phenylisopropyladenosin im Vergleich zu Adenosin als Hemmstoff erhöhter cAMP-Spiegel stärker wirksam war, während N^6-Methyladenosin schwächer als das natürliche Nukleosid wirksam war. Die im Vergleich zu Adenosin stärkere Wirksamkeit des Phenylisopropyladenosins konnte auch an der durch Theophyllin stimulierten Lipolyse nachgewiesen werden (Ebert and Schwabe, 1973; Fredholm, 1978).

Offensichtlich besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen inhibitorischer Wirksamkeit und Lipophilie der N^6-substituierten Adenosinderivate. So ist z.B. N^6-O-Xylyladenosin offensichtlich lipophiler als N^6-Phenyladenosin. Dennoch war N^6-O-Xylyladenosin als Hemmstoff der cAMP-Akkumulation oder der Lipolyse wesentlich schwächer wirksam als N^6-Phenyladenosin. In früheren Untersuchungen mit Phenylisopropyladenosin auf den cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen konnte sogar gezeigt werden, daß das Dextroisomere des Derivats ungefähr 100-fach schwächer wirksam war als das Levoisomere (Prilop, 1976). l- und d-Form des Derivats besitzen jedoch praktisch gleiche lipophile Eigenschaften.

Die Substitution eines H-Atoms in der N^6-Position des Moleküls scheint offenbar keine qualitativen Änderungen der Wirkung von Adenosin auf die Lipolyse und den cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen hervorzurufen. Mit einer Ausnahme, nämlich der durch Adenosindesaminase stimulierten Lipolyse - unter dieser Bedingung ist Adenosin natürlich inhibitorisch unwirksam -, zeigten die N^6-substituierten Adenosinderivate völlige Übereinstimmung mit dem Wirkungsprofil des Adenosins. So hemmten die N^6-substituierten Adenosinderivate den durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt annähernd vollständig. Sie unterdrückten die Theophyllin-Lipolyse vollständig, während sie - genau wie Adenosin - nur eine ca. 50%-ige Hemmung der durch Noradrenalin

submaximal stimulierten Lipolyse hervorriefen.

Ebenso wie Adenosin waren auch die N^6-substituierten Adenosinderivate imstande, in Gegenwart maximal wirksamer Konzentrationen von Noradrenalin eine scheinbare Dissoziation zwischen dem cAMP-Gehalt und der Lipolyse herbeizuführen: eine durch die Nukleoside bewirkte Reduktion erhöhter cAMP-Spiegel auf annähernd basale Werte hatte keinerlei Auswirkungen auf die Lipolyse, da diese weiterhin unvermindert durch Noradrenalin aktiviert wurde. Dieses völlig gegensätzliche Verhalten der Nukleoside auf den cAMP-Gehalt und die Lipolyse, das auch einige andere Substanzen wie z.B. Nikotinsäure oder Prostaglandine zeigen, wurde erst kürzlich systematisch untersucht, indem der Einfluß von Stimulatoren und Inhibitoren auf den cAMP-Gehalt, die Proteinkinaseaktivität und die Lipolyse isolierter Fettzellen aus ein und derselben Zellsuspension parallel untersucht wurde (Wiedbrauck, 1977). Dabei wurde gezeigt, daß der durch Noradrenalin maximal erhöhte cAMP-Gehalt durch maximal inhibitorisch wirksame Konzentrationen von N^6-Phenylisopropyladenosin auf Werte gehemmt wurde, die signifikant höher lagen als die Basalwerte. Dieser "restliche" cAMP-Gehalt, der nach 5 Minuten Inkubation nur ungefähr 9,0 pmol cAMP/10^5 Zellen über dem Basalwert (ca. 7,0 pmol cAMP/10^5 Zellen) lag, reichte jedoch aus, um die Proteinkinase und die Lipolyse maximal zu aktivieren. Erst nach Zusatz von Bupranolol, einem ß-Rezeptorenblocker, wurde der "restliche" cAMP-Gehalt auf basale Werte reduziert; gleichzeitig nahmen auch die Proteinkinaseaktivität und die Lipolyse bis hin zu basalen Werten ab. Diese Versuche zeigen, daß bereits geringe cAMP-Anstiege die Lipolyse maximal aktivieren. Adenosin, von Fettzellen konstant freigesetzt, verhindert folglich die Ausbildung unökonomisch hoher cAMP-Spiegel nach hormoneller Stimulation. Frühere Überlegungen (Fain, 1973a; Stock and Prilop, 1974), daß Hormone außer cAMP noch andere, unbekannte Substanzen bilden, die auch nach "vollständiger" Hemmung der cAMP-Spiegel - also cAMP-unabhängig - eine maximale Aktivierung der Lipolyse auslösen können, sind durch diese Untersuchungen

weitgehend widerlegt.

Wie bereits erwähnt wurde, unterscheiden sich die N^6-substituierten Adenosinderivate von Adenosin in ihrer Resistenz gegenüber dem Enzym Adenosindesaminase. Dies gilt jedoch nur mit Einschränkungen. So konnte gezeigt werden, daß N^6-Methyladenosin durch das Enzym innerhalb von 60 Minuten teilweise abgebaut wurde. Ein Abbau von N^6-Methyladenosin durch das Enzym Adenosindesaminase wurde auch von anderen Autoren beobachtet (Terrine et al., 1969; Agarwal et al., 1975).
In den Untersuchungen von Terrine und Mitarbeitern (1969) wurde Inosin als Abbauprodukt gefunden. Die gleichen Autoren zeigten, daß neben N^6-Methyladenosin auch andere N^6-substituierte Adenosinderivate durch Adenosindesaminase zu Inosin abgebaut werden. Dazu waren allerdings außerordentlich lange Inkubationszeiten erforderlich. So wurde z.B. N^6-Benzyladenosin erst nach einer Inkubationszeit von 90 Stunden zur Hälfte abgebaut. Terrine und Mitarbeiter (1969) zeigten außerdem, daß N^6-substituierte Adenosinderivate die Aktivität der Adenosindesaminase kompetitiv hemmen. Zur Hemmung der Enzymaktivität waren jedoch wesentlich höhere Konzentrationen erforderlich als zur Hemmung der durch Adenosindesaminase ausgelösten Lipolyse. So wurde z.B. für N^6-Benzyladenosin ein K_i-Wert von 4×10^{-4}M angegeben, d.h. bei dieser Konzentration wurde eine 50 %-ige Hemmung der Enzymaktivität beobachtet (Terrine et al., 1969). Wie aus den vorliegenden eigenen Untersuchungen hervorgeht, konnte N^6-Benzyladenosin bereits bei einer Konzentration von 3×10^{-7}M (IC_{50} = 6,5) eine 50 %-ige Hemmung der durch Adenosindesaminase ausgelösten Lipolyse hervorrufen. Die zur Lipolyse-Hemmung erforderlichen Konzentrationen der N^6-substituierten Adenosinderivate dürften infolgedessen die Aktivität der Adenosindesaminase nicht wesentlich beeinträchtigen.

Da die N^6-substituierten Adenosinderivate die Adenosindesaminase-Lipolyse hemmen können, ist es unwahrscheinlich, daß deren inhibitorische Wirkung auf den cAMP-Gehalt und

die Lipolyse allein auf einem "Counterflow" von Adenosin beruht, d.h. auf einer Freisetzung von Adenosin aus der Zelle infolge der Aufnahme der Derivate in die Zelle. Ein solcher Mechanismus wurde z.B. an Erythrozyten beobachtet (Übersicht bei Berlin and Oliver, 1975). Dabei verursachte die Aufnahme von Inosin in die Zelle innerhalb von Sekunden eine Freisetzung von Uridin aus der Zelle. Die "Adenosin-unabhängige" Wirkung sowie das "Adenosin-ähnliche" Wirkungsprofil der N^6-substituierten Adenosinderivate deuten eher darauf hin, daß die Derivate an gleicher Stelle angreifen wie Adenosin selbst.

Unter den verschiedenartig substituierten Adenosinderivaten war 2-Fluoroadenosin das einzige Derivat, das etwas stärker wirksam war als Adenosin. Ähnliche Befunde wurden von Fain und Mitarbeitern (1972) erhoben. Ein Chlor-Atom an gleicher Stelle im Molekül scheint die Wirksamkeit des Adenosins weitaus mehr zu beeinflussen, da Fredholm (1978) zeigen konnte, daß 2-Chloroadenosin sogar 10-fach stärker antilipolytisch wirksam war als Adenosin. Veränderungen an anderer Stelle im Molekül führten in der Regel jedoch zu einer starken Reduktion der inhibitorischen Wirkung des Adenosins auf den cAMP-Anstieg und die Lipolyse isolierter Fettzellen. 1,N^6-Ethenoadenosin - ein Nukleosid, dessen Base über einen Ring mehr verfügt als die des Adenosins - sowie 8,2'-O-Cycloadenosin - ein Nukleosid, in dem Purinbase und Ribose durch eine Ätherbrücke konformativ fixiert sind - waren völlig inaktiv. 7-Deazaadenosin war im Mittel ungefähr 300-fach schwächer wirksam als Adenosin. Fain (1973a) fand hingegen keinen signifikanten Einfluß von 7-Deazaadenosin auf den durch Noradrenalin plus Theophyllin erhöhten cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen. Dies scheint allerdings erklärbar, da das Nukleosid ausschließlich bei einer Konzentration von 10^{-6}M untersucht wurde. In eigenen Versuchen konnte 7-Deazaadenosin erst bei einer Konzentration von 3×10^{-6}M eine 50 %-ige Hemmung des durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalts hervorrufen.

Während gewisse Veränderungen im Puringerüst des Moleküls nur unwesentliche Änderungen der Hemmwirkung von Adenosin auf den cAMP-Gehalt und die Lipolyse isolierter Fettzellen zur Folge hatten, scheint ein intakter Riboserest jedoch außerordentlich bedeutungsvoll zu sein. Adenin, das sich von Adenosin durch das Fehlen der Ribose unterscheidet, zeigte selbst bei einer Konzentration von 1 mM keinen Einfluß auf die durch Noradrenalin oder durch Theophyllin stimulierte Lipolyse (Ebert and Schwabe, 1973). Jedoch nicht nur das Fehlen des Riboserestes, sondern auch schon kleine Veränderungen in der Ribose können die inhibitorische Wirksamkeit des Adenosins an isolierten Zellen bereits drastisch vermindern (Fain et al., 1972; Fain, 1973a; Fredholm, 1978). In eigenen Untersuchungen war 3'-Deoxyadenosin "nur" 50-fach schwächer wirksam als Adenosin, während sich 2'-Deoxyadenosin sowie 2',5'-Dideoxyadenosin als praktisch unwirksam erwiesen. Der im Vergleich zu den anderen Deoxyderivaten relativ geringe Wirksamkeitsverlust, der mit 3'-Deoxyadenosin beobachtet wurde, darf jedoch nicht zu der Annahme führen, daß Veränderungen in der 3'-Position des Adenosinmoleküls generell zu einer weniger ausgeprägten Abnahme der Wirksamkeit führen als Veränderungen an anderer Stelle im Riboserest: durch Methylierung der 3'-OH-Gruppe wurde ein Derivat erhalten, das praktisch unwirksam war.

Die teilweise sehr schwache Wirksamkeit einiger Adenosinderivate ist eventuell auf geringe Verunreinigungen mit Adenosin oder ähnlich wirksamen Substanzen zurückzuführen. Dies scheint zumindest für 2'-Deoxyadenosin zuzutreffen, das, je nach Hersteller, unterschiedlich wirksam war. Durchaus denkbar ist es jedoch, daß diese Derivate einen Eigeneffekt besitzen, der erst bei sehr hohen Konzentrationen sichtbar wird. Ähnliche Schlußfolgerungen zogen Sattin and Rall (1970) aus Untersuchungen mit 2'-Deoxyadenosin, das im Vergleich zu Adenosin nur einen schwachen Effekt auf den cAMP-Gehalt von Gehirnschnitten zeigte. In eigenen dünnschichtchromatographischen Untersuchungen von 2'-Deoxyadenosin wurde weder

Adenosin noch eine andere Verunreinigung gefunden. Dennoch besteht die Möglichkeit, daß andere, durch die Methode nicht erfaßte Verunreinigungen enthalten sind, die gleichermaßen wirksam sind wie Adenosin selbst. Dieses Problem ist wahrscheinlich nur durch eine systematische analytische Untersuchung zu lösen.

Die Struktur-Wirkungsbeziehungen von Adenosin an isolierten Fettzellen zeigen insbesondere die unterschiedliche Bedeutung der Aminogruppe im Puringerüst des Moleküls einerseits und des Ribosezuckers andererseits. Derivate mit einem Substituenten in der Aminogruppe des Purinringes waren durchweg Adenosinagonisten, die zum Teil sogar stärker wirksam waren als das natürliche Nukleosid. Modifikationen des Moleküls im Riboserest führten regelmäßig zu einem meist starken Wirkungsverlust.

Ähnliche Struktur-Wirkungsbeziehungen von Adenosin wurden in anderen Geweben oder Zellen gefunden. An Gehirnschnitten, an denen Adenosin eine Erhöhung des cAMP-Gehalts hervorruft, waren N^6-Alkyl- und N^6-Aryl-Derivate wie N^6-Benzyladenosin oder N^6-Phenylisopropyladenosin Adenosinagonisten. Veränderungen im Riboserest führten hingegen zu einem Verlust der Adenosinwirkung (Übersicht bei Daly, 1976). In Versuchen mit Adenosin und Adenosinderivaten an Gewebsschnitten aus ventrikulärer Herzmuskulatur fanden Huang und Drummond (1976), daß der cAMP-steigernde Effekt von Adenosin durch die Substitution eines H-Atoms in der primären Aminogruppe des Moleküls nicht verändert wurde, während Veränderungen im Riboserest des Moleküls, insbesondere das Fehlen der 2'- oder 3'- oder 5'-Hydroxylgruppe, einen starken Wirkungsverlust hervorriefen. Die durch Adenosindiphosphat (ADP) ausgelöste Aggregation menschlicher Thrombozyten wurde durch N^6-Phenyladenosin stark gehemmt, während 2'-Deoxyadenosin sowie 3'-Deoxyadenosin lediglich schwache inhibitorische Eigenschaften zeigten (Agarwal and Parks, 1975). Um eine 50 %-ige Hemmung der spontanen Kontraktionen des

isolierten Kaninchen-Ileums hervorzurufen, waren von N^6-Methyladenosin ungefähr 10-fach höhere Konzentrationen, von 3'-Deoxyadenosin dagegen 1000-fach höhere Konzentrationen als von Adenosin erforderlich (Ally and Nakatsu, 1976). Ähnliche Befunde an glatter Muskulatur des Kaninchendarms wurden von McKenzie und Mitarbeitern (1977a) erhoben.

Der Verlust der Adenosinwirkung durch Modifikationen im Riboserest scheint jedoch gewebsspezifisch zu sein. Wolff und Cook (1977) fanden, daß 2'-Deoxyadenosin und 5'-Deoxyadenosin als Aktivatoren der Steroidsynthese in Nebennierentumorzellen gleichermaßen wirksam waren wie Adenosin selbst.

In einigen Geweben, so z.B. in Gehirngewebe (Übersicht bei Daly, 1976), wurde gezeigt, daß die Wirkung von Adenosin auf den cAMP-Gehalt durch Deoxyadenosinderivate, wie z.B. 2'- oder 3'-Deoxyadenosin, antagonisiert werden kann. Derartige Wirkungen scheinen die Deoxyadenosinderivate an Fettzellen nicht hervorzurufen. Weder 2'-Deoxyadenosin noch 3'-Deoxyadenosin oder 2',5'-Dideoxyadenosin zeigten einen Einfluß auf die basale Lipolyse. Wären diese Derivate Antagonisten des Adenosins, so hätten sie, ähnlich wie Theophyllin, eine Stimulation der Lipolyse durch Verdrängung von freigesetztem Adenosin bewirken müssen.

Der Effekt von Adenosin auf den cAMP-Gehalt und die Lipolyse isolierter Fettzellen wird wahrscheinlich durch einen Rezeptor auf der Außenseite der Zellmembran vermittelt (Ebert and Schwabe, 1973; Schwabe and Ebert, 1974). Ganz analog sollen Adenosinwirkungen an anderen Geweben durch extrazelluläre Adenosinrezeptoren vermittelt werden. Dazu gehören menschliche Thrombozyten (Haslam and Rosson, 1975), ventrikuläre Herzmuskulatur des Meerschweinchens (Huang and Drummond, 1976), Gehirngewebe verschiedener Spezies (Übersichten bei Daly, 1976; Phillis, 1977), glatte Muskulatur des Kaninchendarms (Ally and Nakatsu, 1976; McKenzie et al., 1977a), menschliche Astrocytomazellen (Clark et al., 1974),

Muskelzellen der Herzkranzgefäße verschiedener Spezies (Olsson et al., 1976; Schrader et al., 1977), Neuroblastomazellen der Maus (Green and Stanberry, 1977), Nebennierentumorzellen (Wolff and Cook, 1977) und menschliche Lymphozyten (Schwartz et al., 1978).

Der Antagonismus zwischen Adenosin und Theophyllin gilt in charakteristischer Weise für alle Gewebe, für die die Existenz extrazellulärer Adenosinrezeptoren angenommen wird und scheint völlig unabhängig von den unterschiedlichen Effekten, die Adenosin in den einzelnen Geweben hervorrufen kann. Vermutlich greift Theophyllin an einem der ersten Schritte einer Folge von biochemischen Reaktionen ein. Einige Autoren vermuten, daß Theophyllin direkt am hypothetischen Adenosinrezeptor wirksam wird und dort mit Adenosin um die Bindung konkurriert (Ebert and Schwabe, 1973; Clark et al., 1974; Schwartz et al., 1978). Diese Hypothese wird von anderen Autoren nicht unterstützt. So vertreten Olsson und Mitarbeiter (1976) die Auffassung, daß der kompetitive Antagonismus zwischen Theophyllin und Adenosin sich nicht notwendigerweise an ein und demselben Rezeptor abspielen muß. Die Interaktion zwischen Adenosin und seinem hypothetischen Rezeptor könnte eine ganze Kette von Reaktionen auslösen, so daß Theophyllin eventuell einen der nachfolgenden Reaktionsschritte kompetitiv hemmen könnte. Green and Stanberry (1977) vermuten sogar eher einen allosterischen als einen kompetitiven Antagonismus zwischen Adenosin und Methylxanthinen und nehmen an, daß die Methylxanthine an anderer Stelle wirksam werden als Adenosin selbst. Solange der Adenosinrezeptor nicht eindeutig durch Bindungsstudien nachgewiesen ist - erst dann kann man ihn näher charakterisieren -, solange bleibt vermutlich auch der exakte Wirkungsmechanismus des Theophyllins unbekannt.

Der extrazelluläre "Adenosinrezeptor" der Fettzelle ist offensichtlich der Hauptangriffspunkt der N^6-substituierten

Adenosinderivate. Dabei scheint die sterische Konfiguration der Substituenten in der N^6-Position für die Affinität der Derivate zum Rezeptor verantwortlich zu sein. Bestimmte Substituenten in der N^6-Position können die Affinität des Adenosins zu seinem Rezeptor sogar erhöhen. Ein intakter Riboserest scheint hingegen insbesondere für die Erkennung des Adenosinmoleküls durch den Rezeptor wichtig zu sein, so daß bereits kleinere Veränderungen an der Ribose zu außerordentlich starken Affinitätsverlusten führen können.

Die Struktur-Wirkungsbeziehungen von Adenosin an Plasmamembranen der Fettzelle waren völlig anders als die an intakten Zellen. Adenosin hemmte den stimulatorischen Effekt von Noradrenalin auf die Adenylatzyklase der Fettzellmembran. Diese Beobachtung bestätigt die mit Adenosin an Fettzell-"ghosts" gefundenen Ergebnisse anderer Autoren (Fain et al., 1972; Schwabe et al., 1975). Zur halbmaximalen Hemmung des Noradrenalineffektes auf die Adenylatzyklase waren jedoch über 1000-fach höhere Adenosinkonzentrationen erforderlich als zur halbmaximalen Hemmung des Noradrenalineffektes auf den cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen. Diese Tatsache allein könnte damit erklärt werden, daß Plasmamembranen der Fettzelle eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der Wirkung von Adenosin zeigen als intakte Fettzellen. Im Gegensatz zu intakten Zellen waren die untersuchten N^6-substituierten Adenosinderivate im zellfreien System jedoch ausnahmslos inaktiv. Diese Befunde bestätigen Ergebnisse mit N^6-Phenylisopropyladenosin, das an intakten Fettzellen stärker inhibitorisch wirksam war als Adenosin (Fain, 1973a), das jedoch keine Wirkung auf die durch Noradrenalin aktivierte Adenylatzyklase von Fettzell-"ghosts" zeigte (Fain et al., 1972). Im Gegensatz zu Adenosin zeigten die N^6-substituierten Adenosinderivate auch keinen inhibitorischen Effekt auf die durch 5'-Guanylylimidodiphosphat oder auf die durch Natriumfluorid aktivierte Adenylatzyklase von Plasmamembranen der Fettzelle. Für die inhibitorische Wirkung des Adenosins auf die Adenylatzyklase im zellfreien

System der Fettzelle scheint demnach eine freie Aminogruppe im Adenosinmolekül absolut erforderlich zu sein.

Außer den N^6-substituierten Adenosinderivaten zeigten auch 7-Deazaadenosin, 1,N^6-Ethenoadenosin, 8,2'-O-Cyclo-adenosin sowie 3'-O-Methyladenosin keinen Einfluß auf die Aktivität der Adenylatzyklase von Plasmamembranen. Im Gegensatz zu den N^6-substituierten Adenosinderivaten waren diese Derivate jedoch auch als Inhibitoren des cAMP-Gehalts oder der Lipolyse isolierter Fettzellen nur schwach wirksam oder völlig unwirksam.

Weder die N^6-substituierten Adenosinderivate noch die anderen im zellfreien System unwirksamen Adenosinderivate konnten die inhibitorische Wirkung von Adenosin auf die Adenylatzyklase beeinflussen. Diese Derivate scheinen also auf keiner Stufe des inhibitorischen Mechanismus zu wirken, den Adenosin an Plasmamembranen auslöst und der eine Hemmung der Adenylatzyklaseaktivität zur Folge hat. Versuche, die Wirkung von Adenosin auf die Adenylatzyklase mit Theophyllin zu antagonisieren, blieben erfolglos. Diese Wirkung von Theophyllin, die an intakten Fettzellen klar gezeigt werden konnte (Ebert and Schwabe, 1973), scheint den Adenosin-effekt im zellfreien System entweder nicht zu betreffen oder wird durch den inhibitorischen Effekt von Theophyllin auf die Adenylatzyklase, der auch an Adenylatzyklase-präparationen vom Meerschweinchenherzen beobachtet wurde (Kruse and Scholz, 1978), verdeckt.

2-Fluoroadenosin war das einzige Adenosinderivat mit ähnlicher relativer Wirksamkeit (P_{REL}-Werten) in beiden Systemen. Sowohl an intakten Zellen als auch an Plasmamembranen im zellfreien System war 2-Fluoroadenosin etwas stärker wirksam als Adenosin.

Die Deoxyadenosin-Derivate, die an intakten Zellen weitaus

schwächer wirksam waren als das natürliche Nukleosid, erwiesen sich im zellfreien System als annähernd gleich oder sogar als stärker wirksam als Adenosin. Ähnliche Befunde wurden von Fain und Mitarbeiter (1972) erhoben, die den Einfluß dieser Derivate auf die Adenylatzyklase-aktivität von Fettzell-"ghosts" untersuchten. Darüberhinaus zeigten die Deoxyadenosinderivate im zellfreien System der Fettzelle gleiche qualitative Eigenschaften wie Adenosin und wirkten inhibitorisch auf die basale und auf die durch Noradrenalin oder 5'-Guanylylimidodiphosphat oder Natriumfluorid stimulierte Adenylatzyklaseaktivität. Das Fehlen der OH-Gruppe in der 5'-Position des Moleküls ist vermutlich der Grund dafür, daß 2',5'-Dideoxyadenosin über eine Größenordnung stärker wirksam war als Adenosin. Im Gegensatz zu Adenosin kann 2',5'-Dideoxyadenosin durch das Enzym Adenosinkinase, das im zellfreien System eine hohe Aktivität aufweisen soll, nicht phosphoryliert werden (Fain et al., 1972; Schwabe et al., 1975). Dies wäre jedoch mehr ein quantitatives als ein qualitatives Problem und würde bedeuten, daß 2',5'-Dideoxyadenosin die "wahre" inhibitorische Wirksamkeit des Adenosins reflektiert. Inwieweit die Wirksamkeit einfach durch das Fehlen funktioneller Gruppen im Riboseteil des Moleküls erhöht wird - auch 3'-Deoxyadenosin war stärker wirksam als Adenosin - scheint nicht geklärt zu sein.

Aus den Versuchen im zellfreien System der Fettzelle wird geschlossen, daß Adenosin in Plasmamembranen an ganz anderer Stelle wirksam wird als an intakten Zellen. Diese Stelle ist dem Nukleosid vermutlich nur im zellfreien System zugänglich, ähnlich wie dies für Natriumfluorid der Fall ist, das seinen charakteristischen stimulatorischen Effekt auf die Adenylatzyklase ausschließlich in zellfreien Systemen zeigt (Holland, 1977; Übersichten bei Robison et al., 1971; Lehotay et al., 1977). Ähnliche Schlußfolgerungen zogen Fain und Wieser (1975) aus Versuchen mit N^6-Phenylisopropyladenosin und 2,5'-Dideoxyadenosin

Sie vermuteten, daß die Wirkung der Adenosinderivate auf die Adenylatzyklase von Fettzell-"ghosts" und auf den cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen über völlig verschiedene Mechanismen verläuft.

Zusammengefaßt deuten die vorliegenden Befunde darauf hin, daß das Adenylatzyklase-System der Fettzelle zwei verschiedene Bindungsstellen für Adenosin besitzt (Abbildung 41). Eine Bindungsstelle ist höchstwahrscheinlich auf der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert. Diese äußere Bindungsstelle scheint physiologisch sowie regulatorisch wichtig zu sein. Nanomolare Adenosinkonzentrationen führen zu einer Interaktion zwischen Adenosin und der äußeren Bindungsstelle. Im Fettgewebe wird die äußere Bindungsstelle vermutlich ständig von Adenosin besetzt. Das dazu erforderliche Adenosin wird kontinuierlich aus den Fettzellen freigesetzt. Wird Adenosin aus der äußeren Bindungsstelle entfernt, so erfolgt eine Aktivierung der Lipolyse, die über das cAMP-System der Fettzelle ablaufen dürfte. N^6-substituierte Adenosinderivate sind Agonisten der äußeren Bindungsstelle. In Abhängigkeit von der Struktur des Substituenten besitzen diese Derivate eine höhere oder geringere Affinität zu dieser Bindungsstelle als Adenosin selbst. Veränderungen im Riboserest reduzieren in hohem Maße die Affinität des Adenosins zur äußeren Bindungsstelle. Theophyllin ist vermutlich ein Antagonist an der äußeren Bindungsstelle von Adenosin.

Die andere Bindungsstelle dürfte auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert sein und scheint nur im zellfreien System zugänglich. Diese innere Bindungsstelle ist vermutlich nicht identisch mit dem katalytischen Zentrum, an dem die Bildung von cAMP aus ATP stattfindet. Diese Vermutung stützt sich auf Untersuchungen von Adenosinwirkungen auf die Adenylatzyklase der Rattenleber

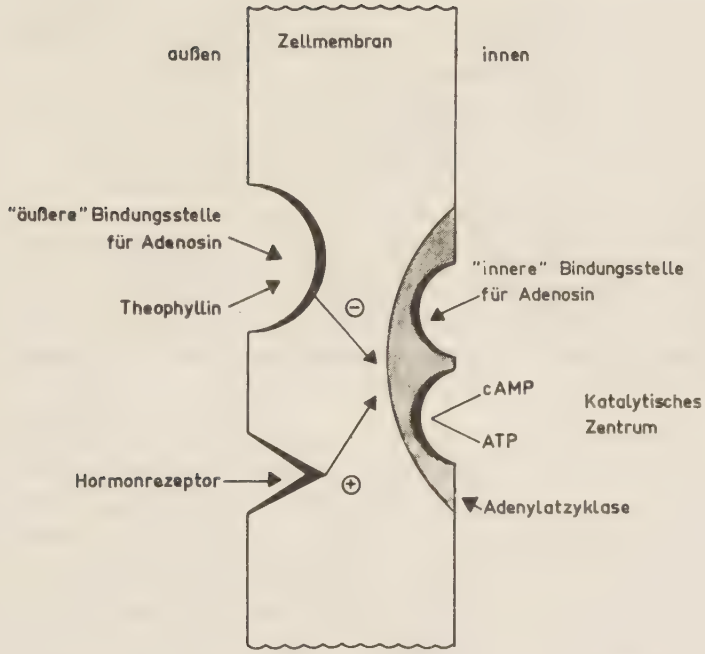


Abb.41: Schematische Darstellung zweier Bindungsstellen für Adenosin an Plasmamembranen der Rattenfettzelle.

(Londos and Preston, 1977) und des Rattenhirns (McKenzie and Bär, 1973). In beiden zellfreien Systemen wirkte Adenosin zwar inhibitorisch auf die Aktivität der Adenylatzyklase, die inhibitorische Wirkung war jedoch unabhängig von der Konzentration an ATP, das als Substrat zugesetzt wurde (nicht-kompetitive Hemmung bezüglich ATP). Mikromolare Adenosinkonzentrationen sind erforderlich, um eine Interaktion zwischen Adenosin und der inneren Bindungsstelle hervorzurufen. Über die physiologische oder regulatorische Bedeutung der inneren Bindungsstelle bestehen noch Unklarheiten. Eventuell ist diese Bindungsstelle verantwortlich für eine unmittelbare Kontrolle der Adenylatzyklaseaktivität.

Diese Vorstellung entspricht einer von Rodbell und Londos (1976) entwickelten Hypothese über die Regulation der Leberadenylatzyklase. Demnach besitzt das Adenylatzyklase-System der Rattenleber vier verschiedene "Effektor"-Bindungsstellen. Die zugehörigen Effektoren sind Glucagon, GTP, Mg^{2+} oder Mn^{2+} sowie Adenosin. Glucagon, GTP und die divalenten Kationen sind positive Effektoren, die über ihre jeweiligen Bindungsstellen die Aktivität der Adenylatzyklase erhöhen, während Adenosin als negativer Effektor die Adenylatzyklaseaktivität über seine Bindungsstelle zu hemmen vermag. Glucagon und die divalenten Kationen können die Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber der inhibitorischen Wirkung des Adenosins erhöhen (Londos and Preston, 1977). Die verschiedenen Effektor-Bindungsstellen sind vermutlich allosterisch verbunden und bilden ein fein abgestimmtes regulatorisches Enzymsystem.

Die Interaktion zwischen Adenosin und der inneren Bindungsstelle von Fettzellen resultiert in einer Hemmung der Adenylatzyklaseaktivität. Im Gegensatz zu den Agonisten der äußeren Bindungsstelle benötigen die Agonisten der inneren Bindungsstelle unbedingt eine freie Aminogruppe im Purinring des Adenosinmoleküls. Hingegen werden gewisse Veränderungen im Riboserest des Adenosinmoleküls von der inneren Bindungsstelle durchaus toleriert. Darüberhinaus kann die Affinität des Adenosins zu dieser Bindungsstelle durch Veränderungen in der Ribose wahrscheinlich sogar erhöht werden. Theophyllin scheint an der inneren Bindungsstelle keine antagonistische Aktivität zu besitzen.

Zwei verschiedene "Adenosin-sensitive" Bindungsstellen fanden Londos und Wolff (1977) auch in Adenylatzyklasepräparationen anderer Gewebe. In Experimenten mit Adenosinanalogen an Plasmamembranen von Thrombozyten, Leberzellen, Leydigtumorzellen und Nebennierentumorzellen konnten die Autoren zwei "Adenosin-reaktive" Bindungsstellen identifizieren, die sie als "R"-Bindungsstelle und als "P"-Bindungsstelle bezeichneten. Die Besetzung der "R"-Bindungsstelle erfordert einen intakten Ribosering im Adenosinmolekül. Die "R"-Bindungsstelle vermittelt gewöhnlich eine Aktivierung der Adenylatzyklase und hat vermutlich die Eigenschaften eines extrazellulären

Membranrezeptors. Agonisten der "P"-Bindungsstelle müssen hingegen einen intakten Purinring im Adenosinmolekül aufweisen. Die "P"-Bindungsstelle vermittelt eine Hemmung der Adenylatzyklaseaktivität und ist vermutlich ein intrazellulärer Bestandteil der Plasmamembran.

Ein Vergleich der eigenen Befunde mit denen von Londos und Wolff (1977) ergibt, daß die "R"-Bindungsstelle vermutlich mit der in dieser Arbeit postulierten äußeren Bindungsstelle identisch ist. Diese Bindungsstelle vermittelt jedoch an Fettzellen inhibitorische Effekte auf die Adenylatzyklase. Die "P"-Bindungsstelle ist vermutlich identisch mit der inneren Bindungsstelle.

Äußere und innere Bindungsstelle sind hilfreich in der Erklärung einiger, bisher nicht gut verstandener Wirkungen von Adenosin in zellfreien Systemen anderer Gewebe. In Thrombozyten erhöht Adenosin den cAMP-Gehalt (Haslam and Rosson, 1975), während im zellfreien System von Thrombozyten biphasische Adenosineffekte beobachtet wurden (Jakobs et al., 1977), d.h. bei niedrigen Adenosinkonzentrationen wurde die Adenylatzyklase aktiviert, bei hohen inhibiert. Londos und Wolff (1977) konnten zeigen, daß der biphasische Effekt von Adenosin auf die Adenylatzyklase von Thrombozyten im zellfreien System durch "R"- und "P"-Bindungsstellen vermittelt wird. Die "R"-Bindungsstelle vermittelt die stimulatorische Wirkung - reflektiert also den Mechanismus an intakten Zellen - , die "P"-Bindungsstelle vermittelt hingegen die inhibitorische Wirkung von Adenosin. Biphasische Effekte von Adenosin, die auch an Adenylatzyklasepräparationen aus anderen Geweben, wie z.B. aus Astrocytomazellen (Clark and Seney, 1976) gesehen wurden, beruhen also auf einer gegensätzlichen "Polung" von äußerer und innerer Bindungsstelle gegenüber ein und derselben Adenylatzyklase.

In Gehirngewebe bewirkt Adenosin oder N^6-Phenylisopropyladenosin

eine Erhöhung des cAMP-Gehalts (Übersicht bei Daly, 1976). In zellfreien Präparationen aus Gehirngewebe fanden McKenzie und Bär (1973) mit Adenosin nur inhibitorische Wirkungen auf die Adenylatzyklase. Hingegen fanden Premont und Mitarbeiter (1977), daß N^6-Phenylisopropyladenosin die Adenylatzyklase aus Gehirngewebe stimuliert. Vermutlich wurden mit Adenosin nur Wirkungen an der inneren Bindungsstelle beobachtet, während mit N^6-Phenylisopropyladenosin Wirkungen an der äußeren Bindungsstelle demonstriert werden konnten, da dieses Derivat ein spezifischer Agonist der äußeren Bindungsstelle zu sein scheint. Außerdem reflektiert die stimulatorische Wirkung von N^6-Phenylisopropyladenosin auf die Adenylatzyklase vermutlich sogar den Mechanismus, der im Gewebe zu einer Erhöhung der cAMP-Spiegel führt.

An glatter Muskulatur des Darmes bewirkt Adenosin eine Relaxation, die über einen unbekannten, cAMP-unabhängigen Mechanismus verlaufen soll (McKenzie et al., 1977b). Diese muskelrelaxierende Wirkung des Adenosins scheint jedoch auch durch einen extrazellulären Rezeptor vermittelt zu werden (McKenzie et al., 1977a). Dieser Rezeptor kann eindeutig als äußere Bindungsstelle von Adenosin identifiziert werden, wenn man die untersuchten Struktur-Wirkungsbeziehungen (McKenzie et al., 1977a) einer erneuten Betrachtung unterzieht. Im zellfreien System aus glatter Darmmuskulatur wurden wieder inhibitorische Effekte von Adenosin auf die Adenylatzyklase beobachtet (McKenzie et al., 1977b), die auf Grund der untersuchten Struktur-Wirkungsbeziehungen offensichtlich durch die innere Bindungsstelle vermittelt werden.

Diese drei Beispiele zeigen, daß die innere Bindungsstelle immer inhibitorische Wirkungen auf die Adenylatzyklase vermittelt. Hingegen vermittelt die äußere Bindungsstelle sowohl stimulatorische wie auch inhibitorische Wirkungen auf die Adenylatzyklase. Die äußere Bindungsstelle kann vielleicht sogar fehlen, obgleich die innere Bindungsstelle vorhanden ist; zumindest muß sie nicht notwendigerweise mit dem Adenylatzyklase-System in Verbindung stehen, wie dies in der glatten

Darmmuskulatur der Fall zu sein scheint. Umgekehrt scheint die innere Bindungsstelle immer mit der Adenylatzyklase in Verbindung zu stehen und ist vermutlich sogar eine Untereinheit dieses Enzymsystems. Ähnliche Schlußfolgerungen zogen Londos und Wolff (1977).

Die experimentelle Prüfung der Arbeitshypothese von zwei Adenosinbindungsstellen steckt bisher noch in den Anfängen. Eine erste Arbeit dieser Art wurde erst kürzlich von Malbon und Mitarbeitern (1978) veröffentlicht. Sie beschreibt Untersuchungen über die Bindung von (^{3}H)-Adenosin an Plasmamembranen der Fettzelle. Die Autoren fanden zwei Adenosin-Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität: eine mit hoher und eine mit geringer Affinität für Adenosin. Für die Bindungsstelle mit hoher Affinität wurde eine scheinbare ("apparent") Dissoziationskonstante (K_d) von ungefähr 10 µM Adenosin angegeben, während für die mit geringer Affinität eine scheinbare Dissoziationskonstante von ungefähr 1 mM Adenosin angegeben wurde. N^6-Phenylisopropyladenosin (1 -100 µM) zeigte keinen Einfluß auf die Bindung von (^{3}H)-Adenosin an Plasmamembranen der Fettzelle. Hingegen konnte 2',5'-Dideoxyadenosin (1 - 100 µM) die Bindung von (^{3}H)-Adenosin hemmen. In Gegenwart von 100 µM 2',5'-Dideoxyadenosin wurde die Bindung von (^{3}H)-Adenosin an Plasmamembranen um ca. 54 % reduziert. Aus ihren Untersuchungen schlossen die Autoren, daß die Bindungsstelle mit hoher Affinität für Adenosin diejenige zu sein scheint, an der auch 2',5'-Dideoxyadenosin seinen inhibitorischen Einfluß auf die Adenylatzyklase ausübt.

Diese Bindungsstelle mit hoher Affinität scheint identisch mit der in dieser Arbeit postulierten inneren Bindungsstelle von Adenosin, an der sich die Deoxyadenosinderivate als Agonisten erwiesen, die N^6-substituierten Adenosinderivate hingegen nicht. Dies scheint ziemlich sicher, zumal die scheinbare Dissoziationskonstante (K_d) von Adenosin an dieser Bindungsstelle und der IC_{50}-Wert von Adenosin nach Aktivierung der Adenylatzyklase durch Noradrenalin praktisch übereinstimmen.

Für beide Werte wurde eine Adenosinkonzentration von ungefähr 10 µM ermittelt.

Warum Adenosinwirkungen an der äußeren Bindungsstelle in zellfreien Systemen der Fettzelle nicht gefunden wurden - weder durch Bindungsstudien noch durch Messung der Adenylatzyklaseaktivität (auch nicht in Gegenwart von Adenosindesaminase!) - blieb bislang unklar. Fain und Wieser (1975) hatten sogar angenommen, daß diese Bindungsstellen schon bei der Präparation von Fettzell-"ghosts" aus intakten Fettzellen verloren gehen könnten. Dies ist offensichtlich nicht der Fall. Nach Abschluß und Publikation von Teilen der vorliegenden Arbeit (Trost and Stock, 1976; Trost, 1977 ; Trost and Stock, 1977 ; Trost and Stock, 1978; Übersicht bei Trost and Stock, 1979) konnten Londos und Mitarbeiter (1978) inhibitorische Wirkungen N^6-substituierter Adenosinderivate auf die Adenylatzyklase von Plasmamembranen der Fettzelle nachweisen, wodurch bewiesen sein dürfte, daß die äußere Bindungsstelle von Adenosin auch im zellfreien System der Fettzelle existiert.

Um Effekte von Nukleosiden an der äußeren Bindungsstelle demonstrieren zu können, waren allerdings "inhibitorische" Konzentrationen von GTP erforderlich. GTP zeigte einen biphasischen Effekt auf die durch Isoproterenol aktivierte Adenylatzyklase von Plasmamembranen der Fettzelle. Bei niedrigen Konzentrationen - ungefähr im Bereich von 10^{-9} - 10^{-7}M - bewirkte GTP eine Verstärkung der Isoproterenol-Wirkung, die bei einer GTP-Konzentration von ca. 10^{-7}M ein Maximum erreichte. Mit zunehmender GTP-Konzentration (> 10^{-7}M) wurde die maximale Adenylatzyklaseaktivität konzentrationsabhängig reduziert, so daß die Konzentrations-Wirkungskurve von GTP auf die aktivierte Adenylatzyklase einen glockenförmigen Verlauf zeigte. Ausschließlich in der "inhibitorischen" Phase, also im absteigenden Teil der Kurve, zeigten die N^6-substituierten Adenosinderivate inhibitorische Effekte, wobei

lediglich ein Teil der gesamten Adenylatzyklaseaktivität gehemmt wurde. Ferner wurde den Inkubaten Adenosindesaminase zugesetzt, um Adenosin, das durch Abbau von ATP oder cAMP entstehen kann, zu unwirksamem Inosin umzusetzen. Unter diesen Bedingungen fanden Londos und Mitarbeiter (1978) inhibitorische Wirkungen von verschiedenen N^6-substituierten Adenosinderivaten, u.a. von N^6-Methyladenosin, N^6-Propyladenosin oder N^6-Cyclohexyladenosin, also von Derivaten, die auch in der vorliegenden Arbeit untersucht worden waren. Der inhibitorische Effekt von N^6-Methyladenosin wurde durch Theophyllin kompetitiv antagonisiert, wobei für Theophyllin ein K_i-Wert von 7 µM angegeben wurde. Obwohl ein direkter Vergleich mit den eigenen Untersuchungsergebnissen nur mit Einschränkungen zulässig ist, stimmt der von Londos und Mitarbeitern (1978) erhaltene Wert auffällig überein mit dem in der vorliegenden Arbeit ermittelten IC_{50}-Wert von N^6-Methyladenosin (IC_{50} = 5,2 entsprechend 6,3 µM; s. Tabelle 1) bei Stimulation der Lipolyse isolierter Fettzellen durch 1 mM Theophyllin. Londos und Mitarbeiter (1978) fanden, daß Theophyllin auch die inhibitorische Wirkung anderer N^6-substituierter Adenosinderivate antagonisierte, während der inhibitorische Effekt von 2',5'-Dideoxyadenosin - ein Agonist der inneren, GTP-unabhängigen Bindungsstelle - durch Theophyllin nicht beeinflußt wurde. Dieser Befund bestätigt die eigenen Ergebnisse mit Adenosin und deutet ebenfalls darauf hin, daß Theophyllin ausschließlich Adenosineffekte an der äußeren Bindungsstelle zu antagonisieren vermag.

Für die N^6-substituierten Adenosinderivate gaben Londos und Mitarbeiter (1978) folgende K_i-Werte an: N^6-Propyladenosin 5 nM; N^6-Cyclohexyladenosin 10 nM; N^6-Methyladenosin 200 nM. In der vorliegenden Arbeit wurden für die gleichen Derivate bei Erhöhung des cAMP-Gehalts isolierter Fettzellen durch 1 µM Noradrenalin folgende IC_{50}-Werte ermittelt (s.Tabelle 1): N^6-Propyladenosin 8,7 = 2 nM; N^6-Cyclohexyladenosin 9,2 = 0,6 nM; N^6-Methyladenosin 7,2 = 60 nM. Soweit ein direkter

Vergleich zwischen den K_i-Werten aus der Untersuchung von Londos und Mitarbeitern (1978) und den IC_{50}-Werten aus der vorliegenden eigenen Untersuchung möglich ist, ergibt sich eine gute Übereinstimmung zwischen dem K_i-Wert und dem IC_{50}-Wert von N^6-Propyladenosin, während N^6-Cyclohexyladenosin sowie N^6-Methyladenosin an Plasmamembranen im zellfreien System schwächer wirksam waren als an isolierten Fettzellen. N^6-Methyladenosin war jedoch auch im zellfreien System deutlich schwächer wirksam als die beiden anderen Derivate, so daß die Affinität der Derivate zur äußeren Bindungsstelle tatsächlich von der Struktur des Substituenten in der N^6-Position des Adenosinmoleküls abzuhängen scheint.

Diese Schlußfolgerung bleibt jedoch immer noch weitgehend spekulativ. Londos und Mitarbeiter (1978) gaben nämlich an, daß die meisten Experimente in Gegenwart von Adenosindesaminase durchgeführt wurden. Ob der K_i-Wert von N^6-Methyladenosin in Abwesenheit oder Gegenwart von Adenosindesaminase ermittelt wurde,und ob N^6-Methyladenosin durch Adenosindesaminase unter den Bedingungen der Inkubation (Inkubationszeit 30 min bei 24°C) abgebaut wurde, blieb offen. Die Autoren schlossen aus ihren Untersuchungen, daß GTP auch zur Vermittlung von Adenosineffekten auf den cAMP-Gehalt und die Lipolyse isolierter Fettzellen erforderlich sei. Darüberhinaus nahmen sie an, daß GTP ganz allgemein beim Interaktionsprozess zwischen etrazellulären Rezeptoren und der Adenylatzyklase eine zentrale Rolle spielen könnte.

Der endgültige Beweis für die Existenz zweier Adenosin-Bindungsstellen an Plasmamembranen der Fettzelle steht bisher noch aus. Um entsprechende Bindungsstudien an der äußeren bzw. an der inneren Bindungsstelle durchführen zu können, fehlen bis heute noch die erforderlichen radioaktiv markierten Adenosinverbindungen mit hoher Affinität und Spezifität.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Adenosin wird aus isolierten Rattenfettzellen kontinuierlich freigesetzt und hemmt die cAMP-Akkumulation und die Lipolyse. Diese Wirkungen des Adenosins kommen vermutlich durch eine Hemmung der membrangebundenen Adenylatzyklase zustande, die auch an Membranpräparationen im zellfreien System der Rattenfettzelle beobachtet wurde. Das Derivat N^6-Phenylisopropyladenosin hemmt ebenfalls die cAMP-Akkumulation und die Lipolyse isolierter Fettzellen und war auf molarer Basis sogar stärker wirksam als Adenosin selbst. Im Gegensatz zum natürlichen Nukleosid zeigte N^6-Phenylisopropyladenosin jedoch keine inhibitorische Wirkung auf die Adenylatzyklase im zellfreien System der Fettzelle.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die inhibitorische Wirkung von Adenosin an isolierten Rattenfettzellen und an Plasmamembranen der Rattenfettzelle mit Hilfe verschiedener Adenosinderivate näher zu charakterisieren. Verwendet wurden verschiedene N^6-substituierte Adenosinderivate sowie verschiedenartig substituierte Adenosinderivate.

5.1. Untersuchungen an isolierten Rattenfettzellen

Adenosin und die N^6-substituierten Adenosinderivate hemmten konzentrationsabhängig den durch 1 µM Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalt isolierter Fettzellen. Bei einer Konzentration von 8 nM bewirkte Adenosin eine 50 %-ige Hemmung, während die 50 % Hemmkonzentrationen (IC_{50}) der N^6-substituierten Adenosinderivate im Bereich von 0,6 - 126 nM lagen. Auf Grund ihrer unterschiedlichen inhibitorischen Wirksamkeit bildeten Adenosin und die N^6-substituierten Derivate innerhalb dieses Konzentrationsbereiches eine bestimmte Reihenfolge, in der Adenosin an mittlerer Stelle steht.

Sowohl Adenosin als auch die N^6-substituierten Adenosinderivate bewirkten eine Dissoziation zwischen dem cAMP-Gehalt und der

Lipolyse: Die Nukleoside zeigten bei Konzentrationen, bei denen der durch Noradrenalin maximal erhöhte cAMP-Gehalt bereits auf annähernd basale Werte reduziert worden war, praktisch keine Hemmwirkung auf die Lipolyse. Erst bei submaximal wirksamen Noradrenalinkonzentrationen riefen Adenosin und die N^6-substituierten Derivate eine konzentrationsabhängige, jedoch nur partielle Hemmung der Lipolyse hervor, die ungefähr 50 % des stimulierten Ausgangswertes umfasste. Für die N^6-substituierten Adenosinderivate einschließlich des Adenosins fand sich ein gleicher Hemmbereich von ca. zwei Zehnerpotenzen sowie eine ähnliche Reihenfolge inhibitorischer Wirksamkeit wie nach Hemmung des durch Noradrenalin ausgelösten cAMP-Anstiegs.

Adenosin und die N^6-substituierten Derivate hemmten die durch 1 mM Theophyllin stimulierte Lipolyse konzentrationsabhängig und nahezu vollständig. Bezüglich der Reihenfolge inhibitorischer Wirksamkeit sowie des Hemmbereiches ergaben sich ähnliche Befunde wie nach Hemmung des durch Noradrenalin aktivierten Systems.

Auch die durch Adenosindesaminase ausgelöste Lipolyse wurde durch die N^6-substituierten Adenosinderivate konzentrationsabhängig und nahezu vollständig gehemmt. Mit Ausnahme von N^6-Methyladenosin, das vom Enzym abgebaut wurde, fand sich für die übrigen N^6-substituierten Adenosinderivate auch hier ein Hemmbereich von ungefähr zwei Zehnerpotenzen sowie eine ähnliche Reihenfolge inhibitorischer Wirksamkeit wie bei den vorangegangenen Untersuchungen.

Unter den verschiedenartig substituierten Adenosinderivaten war 2-Fluoroadenosin die einzige Substanz, die stärker als Adenosin wirksam war. Dies wurde sowohl nach Hemmung des durch Noradrenalin erhöhten cAMP-Gehalts als auch nach Hemmung der durch Theophyllin stimulierten Lipolyse beobachtet. Substitution an anderer Stelle im Adenosinmolekül führte zu einer meist starken Reduktion der Adenosinwirkung auf den cAMP-Gehalt und

die Lipolyse isolierter Fettzellen. 1,N^6-Ethenoadenosin sowie 8,2'-O-Cycloadenosin waren bis zu einer Konzentration von 0,1 mM unwirksam. Praktisch unwirksam waren 2',5'-Dideoxyadenosin, 3'-O-Methyladenosin sowie 2'-Deoxyadenosin. 7-Deazaadenosin war ca. 300-fach, 3'-Deoxyadenosin war ca. 50-fach schwächer wirksam als Adenosin.

5.2. Untersuchungen an Plasmamembranen der Rattenfettzelle

Adenosin hemmte konzentrationsabhängig die basale und die durch 10 µM Noradrenalin stimulierte Adenylatzyklaseaktivität von Plasmamembranen der Rattenfettzelle. Zur 50 %-igen Hemmung der durch Noradrenalin aktivierten Adenylatzyklase war eine Adenosinkonzentration von 13 µM erforderlich, also eine ca. 1000-fach höhere Konzentration als zur Hemmung der durch Noradrenalin ausgelösten cAMP-Akkumulation isolierter Fettzellen. Eine ähnliche Hemmwirkung zeigte Adenosin nach Aktivierung der Adenylatzyklase durch 5'-Guanylylimidodiphosphat oder Natriumfluorid.

Im Gegensatz zu Adenosin waren die N^6-substituierten Adenosinderivate im zellfreien System ausnahmslos unwirksam; weder die basale noch die durch Noradrenalin, 5'-Guanylylimidodiphosphat oder Natriumfluorid stimulierte Adenylatzyklase wurde beeinflußt. N^6-Cyclohexyladenosin, das an intakten Zellen inhibitorisch wirksamste Derivat, zeigte auch in Gegenwart des Enzyms Adenosindesaminase, welches das bei der Inkubation aus ATP entstandene Adenosin zu inhibitorisch unwirksamem Inosin abbaut, keine Wirkung auf die Adenylatzyklaseaktivität.

Auch die folgenden, verschiedenartig substituierten Adenosinderivate waren im zellfreien System der Fettzelle unwirksam: 1,N^6-Ethenoadenosin, 8,2'-O-Cycloadenosin, 7-Deazaadenosin und 3'-O-Methyladenosin.

Alle Adenosinderivate, die die Adenylatzyklase im zellfreien System nicht hemmten, zeigten auch keine adenosinantagonistische

Wirkung an der durch Noradrenalin aktivierten Adenylatzyklase. Ein Antagonismus von Theophyllin gegenüber der Wirkung von Adenosin, wie er an isolierten Fettzellen besteht, konnte im zellfreien System der Fettzelle nicht nachgewiesen werden.

Ähnlich wie an isolierten Zellen war 2-Fluoroadenosin an Plasmamembranen 2-fach stärker wirksam als Adenosin selbst.

Die Deoxyadenosin-Derivate, die an intakten Fettzellen nur schwache Wirksamkeit zeigten, waren im zellfreien System annähernd gleich wirksam wie Adenosin oder sogar stärker wirksam als Adenosin. Bei Hemmung der durch Noradrenalin aktivierten Adenylatzyklase war 2'-Deoxyadenosin auf molarer Basis 2-fach stärker, 3'-Deoxyadenosin 8-fach stärker und 2',5'-Dideoxyadenosin 40-fach stärker wirksam als Adenosin. Die Hemmwirkung der Deoxyadenosin-Derivate erstreckte sich auch auf die basale sowie auf die durch 5'-Guanylylimidodiphosphat oder Natriumfluorid stimulierte Adenylatzyklase.

5.3. Schlußfolgerung

Die unterschiedlichen Struktur-Wirkungsbeziehungen von Adenosin an intakten Fettzellen und an Plasmamembranen im zellfreien System deuten darauf hin, daß an Zellmembranen der Fettzelle zwei verschiedene Adenosin-Bindungsstellen existieren.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Agarwal, K.C., Parks, R.E.: Adenosine analogs and human platelets. Effects on nucleotide pools and the aggregation phenomenon. Biochem. Pharmacol. 24, 2239-2248 (1975)

Agarwal, R.P., Sagar, S.M., Parks, R.E.: Adenosine deaminase from human erythrocytes: purification and effects of adenosine analogs. Biochem. Pharmacol. 24, 693-701 (1975)

Ally, A.I., Nakatsu, K.: Adenosine inhibition of isolated rabbit ileum and antagonism by theophylline. J. Pharmacol. Exp. Ther. 199, 208-215 (1976)

Appleman, M.M., Terasaki, W.L.: Regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (G.I. Drummond, P. Greengard, G.A. Robison, eds.) Vol. 5, pp. 153-162. New York: Raven Press 1975

Appleman, M.M., Thompson, W.J., Russell, T.R.: Cyclic nucleotide phosphodiesterases. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (P. Greengard, G.A. Robison, eds.) Vol. 3, pp. 65-98. New York: Raven Press 1973

Beavo, J.A., Rogers, N.L., Crofford, O.B., Hardman, J.G., Sutherland, E.W., Newman, E.V.: Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity. Mol. Pharmacol. 6, 597-603 (1970)

Berlin, R.D., Oliver, J.M.: Membrane transport of purine and pyrimidine bases and nucleosides in animal cells. Int. Rev. Cytol. 42, 287-336 (1975)

Birnbaumer, L.: Hormone-sensitive adenylyl cyclases. Useful models for studying hormone receptor functions in cell-free systems. Biochim. Biophys. Acta 300, 129-158 (1973)

Birnbaumer, L.: Regulatory events at the level of membrane-bound adenylate cyclase. In: Cyclic 3',5'-Nucleotides: Mechanisms of Action (H. Cramer, J. Schultz, eds.) pp. 13-36. London-New York-Sydney-Toronto: John Wiley + Sons 1977

Birnbaumer, L., Pohl, S.L., Rodbell, M.: Adenyl cyclase in fat cells. 1. Properties and the effects of adrenocorticotropin and fluoride. J. Biol. Chem. 244, 3468-3476 (1969)

Blackard, W.G., Cameron, T.: Influence of nucleotide derivatives on lipolysis and lipid peroxide formation in vitro. Metabolism 16, 91-95 (1967)

Brech, W.J., Gordon, E.S.: Die physiologische Rolle des Fettgewebes. Klin. Wochenschr. 45, 905-917 (1967)

Brodie, B.B., Maickel, R.P., Stern, D.N.: Autonomic nervous system and adipose tissue. In: Handbook of Physiology, section 5 (A.E. Renold, G.F. Cahill, eds.) pp. 583-600. Washington: Americ. Physiol. Soc. 1965

Butcher, R.W.: The second messenger concept and lipid metabolism. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 269, 358-372 (1971)

Chasin, M., Harris, D.N.: Inhibitors and activators of cyclic nucleotide phosphodiesterase. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (P. Greengard, G.A. Robison, eds.) Vol. 7, pp. 225-264. New York: Raven Press 1976

Chen, R.F.: Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. J. Biol. Chem. 242, 173-181 (1967)

Clark, R.B., Seney, M.N.: Regulation of adenylate cyclase from cultured human cell lines by adenosine. J. Biol. Chem. 251, 4239-4246 (1976)

Clark, R.B., Gross, R., Su, Y.F., Perkins, J.P.: Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate content in human astrocytoma cells by adenosine and the adenine nucleotides. J. Biol. Chem. 249, 5296-5303 (1974)

Corbin, J.D., Keely, S.L., Soderling, T.R., Park, C.R.: Hormonal regulation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (G.I. Drummond, P. Greengard, G.A. Robison, eds.) Vol. 5, pp. 265-279. New York: Raven Press 1975

Cuatrecasas, P.: Membrane receptors. Annu. Rev. Biochem. 43, 169-214 (1974)

Cuatrecasas, P.: Hormone receptors - Their function in cell membranes and some problems related to methodology. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (G.I. Drummond, P. Greengard, G.A. Robison, eds.) Vol. 5, pp. 79-104. New York: Raven Press 1975

Daly, J.W.: The nature of receptors regulating the formation of cyclic AMP in brain tissues. Life Sci. 18, 1349-1358 (1976)

Daly, J.W.: Cyclic nucleotides in the nervous system. New York and London: Plenum Press 1977

Davies, J.I.: In vitro regulation of the lipolysis of adipose tissue. Nature (Lond.) 218, 349-352 (1968)

Dinnendahl, V.: Effekte von Neurotransmittern und Pharmaka auf die zyklischen Nukleotide im Zentralnervensystem. Habilitationsschrift, Medizinische Hochschule Hannover (1976)

Dole, V.P.: Effect of nucleic acid metabolites on lipolysis in adipose tissue. J. Biol. Chem. 236, 3125-3130 (1961)

Ebert, R., Schwabe, U.: Antilipolytic effect of adenosine and purine bases in isolated fat cells. Acta Pharmacol. Toxicol. 29, (Suppl. 4), 10 (1971)

Ebert, R., Schwabe, U.: Studies on the antilipolytic effect of adenosine and related compounds in isolated fat cells. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 278, 247-259 (1973)

Ebert, R., Schwabe, U.: Biphasic effect of 5'-guanylylimidodiphosphate on fat cell adenylate cyclase. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 286, 297-313 (1974)

Fain, J.N.: Inhibition of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate accumulation in fat cells by adenosine, N^6-(phenylisopropyl) adenosine, and related compounds. Mol. Pharmacol. 9, 595-604 (1973a)

Fain, J.N.: Biochemical aspects of drug and hormone action on adipose tissue. Pharmacol. Rev. 25, 67-118 (1973b)

Fain, J.N.: Cyclic nucleotides in adipose tissue. In: Cyclic 3',5'-Nucleotides: Mechanisms of Action (H. Cramer, J. Schultz, eds.) pp. 207-228. London-New York-Sydney-Toronto: John Wiley + Sons 1977

Fain, J.N., Wieser, P.B.: Effects of adenosine deaminase on cyclic adenosine monophosphate accumulation, lipolysis, and glucose metabolism of fat cells. J. Biol. Chem. 250, 1027-1034 (1975)

Fain, J.N., Pointer, R.H., Ward, W.F.: Effects of adenosine nucleosides on adenylate cyclase, phosphodiesterase, cyclic adenosine monophosphate accumulation, and lipolysis in fat cells. J. Biol. Chem. 247, 6866-6872 (1972)

Fain, J.N., Shepherd, R.E., Malbon, C.C., Moreno, F.J.: Hormonal regulation of the breakdown of triglyceride in adipocytes. In: Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism. Clinical Physiology Series (J.M. Dietschy, A.M. Gotto, J.A. Ontko, eds.) pp. 213-228. Bethesda: Americ. Physiol. Soc. 1978

Fredholm, B.B.: Effect of adenosine, adenosine analogues and drugs inhibiting adenosine inactivation on lipolysis in rat fat cells. Acta physiol. scand. 102, 191-198 (1978)

Frowein, J., Petersen, K.-G.: Rezeptoren für Polypeptidhormone. Dtsch. med. Wschr. 101, 623-627 (1976)

Gilman, A.G.: A protein binding assay for adenosine-3',5'-cyclic monophosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 67, 305-312 (1970)

Gilman, A.G.: Protein binding assays for cyclic nucleotides. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (P. Greengard, G.A. Robison, eds.) Vol. 2, pp. 9-24. New York: Raven Press 1972

Greaves, M.F.: Membrane receptor-adenylate cyclase relationships. Nature (London) 265, 681-683 (1977)

Green, R.D., Stanberry, L.R.: Elevation of cyclic AMP in C-1300 murine neuroblastoma by adenosine and related compounds and the antagonism of this response by methylxanthines. Biochem. Pharmacol. 26, 37-43 (1977)

Haslam, R.J., Rosson, G.M.: Effects of adenosine on levels of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate in human blood platelets in relation to adenosine incorporation and platelet aggregation. Mol. Pharmacol. 11, 528-544 (1975)

Havel, R.J.: Autonomic nervous system and adipose tissue. In: Handbook of Physiology, section 5 (A.E. Renold, G.F. Cahill, eds.) pp. 575-582. Washington: Americ. Physiol. Soc. 1965

Helmreich, E.J.M.: Hormone-receptor interactions. FEBS Lett. 61, 1-5 (1976)

Holland, R.I.: Effect of fluoride on glycerol production in rat adipocytes in vitro. Acta pharmacol. et toxicol. 41, 97-102 (1977)

Holzbauer, M., Sharman, D.F.: The distributions of catecholamines in vertebrates. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie (O. Eichler, A. Farah, H. Herken, A.D. Welch, eds.) Vol. 33, pp. 110-185. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag 1972

Huang, M., Drummond, G.I.: Effect of adenosine on cyclic AMP accumulation in ventricular myocardium. Biochem. Pharmacol. 25, 2713-2719 (1976)

Jakobs, K.H., Johnson, R.A.,Saur, W.: Effects of adenosine on platelet adenylate cyclase activity. Naunyn -Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 297, (Suppl.2), R 13 (1977)

Jeanrenaud, B.: Adipose tissue dynamics and regulation, revisited Ergebn. Physiol. 60, 57-140 (1968)

Kahn, C.R.: Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. J. Cell. Biol. 70, 261-286 (1976)

Kappeler, H.: Zur Pharmakologie der Lipolysehemmung. I. Wirkungsweise adenosinhaltiger Nucleoside und Nucleotide auf die Lipolyse des Fettgewebes in vitro. Diabetologia 2, 52-61 (1966)

Klotz, U.: Anreicherung, Trennung, Eigenschaften und pharmakologische Beeinflussung von 3',5'-Nukleotid-Phosphodiesterasen des epididymalen Fettgewebes der Ratte. Inauguraldissertation, Technische Universität Hannover (1972)

Kruse, E., Scholz, H.: Effect of theophylline on myocardial adenylate cyclase activity. Experientia 34, 504-505 (1978)

Lambert, M., Neish, A.C.: Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions. Can. J. Res., Sect. B 28, 83-89 (1950)

Langan, T.A.: Protein kinases and protein kinase substrates. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (P. Greengard, G.A. Robison, eds.) Vol. 3, pp. 99-153. New York: Raven Press 1973

Lehotay, D.C., Lo, K.H., Levey, G.S.: Activation of adenylate cyclase: requirement for phospholipids. In: Cyclic 3',5'-Nucleotides: Mechanisms of Action (H. Cramer, J. Schultz, eds.) pp. 1-12. London-New York-Sydney-Toronto: John Wiley + Sons 1977

Londos, C., Preston, M.S.: Regulation by glucagon and divalent cations of inhibition of hepatic adenylate cyclase by adenosine. J. Biol. Chem. 252, 5951-5956 (1977)

Londos, C., Rodbell, M.: Adenylate cyclase: actions and interactions of regulatory ligands. In: Drug Action at the Molecular Level (G.C.K. Roberts, ed.) pp. 235-247. London: Macmillan Press 1977

Londos, C., Wolff, J.: Two distinct adenosine-sensitive sites on adenylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5482-5486 (1977)

Londos, C., Cooper, D.M.F., Schlegel, W., Rodbell, M.: Adenosine analogs inhibit adipocyte adenylate cyclase by a GTP-dependent process: basis for actions of adenosine and methylxanthines on cyclic AMP production and lipolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5362-5366 (1978)

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

Malbon, C.C., Hert, R.C., Fain, J.N.: Characterization of (^{3}H) adenosine binding to fat cell membranes. J. Biol. Chem. 253, 3114-3122 (1978)

Manganiello, V.C., Vaughan, M.: Activation and inhibition of fat cell adenylate cyclase by fluoride. J. Biol. Chem. 251, 6205-6209 (1976)

McKeel, D.W., Jarett, L.: Preparation and characterization of a plasma membrane fraction from isolated fat cells. J. Cell. Biol. 44, 417-432 (1970)

McKenzie, S.G., Bär, H.P.: On the mechanism of adenyl cyclase inhibition by adenosine. Can. J. Physiol. Pharmacol. 51, 190-196 (1973)

McKenzie, S.G., Frew, R., Bär, H.P.: Characteristics of the relaxant response of adenosine and its analogs in intestinal smooth muscle. European J. Pharmacol. 41, 183-192 (1977a)

McKenzie, S.G., Frew, R., Bär, H.P.: Effects of adenosine and related compounds on adenylate cyclase and cyclic AMP levels in smooth muscle. European J. Pharmacol. 41, 193-203 (1977b)

Miller, J.P.: Cyclic nucleotide analogues. In: Cyclic 3',5'-Nucleotides: Mechanisms of Action (H. Cramer, J. Schultz, eds.) pp. 77-105. London-New York-Sydney-Toronto: John Wiley + Sons 1977

Miyamoto, E., Kuo, J.F., Greengard, P.: Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. III. Purification and properties of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine brain. J. Biol. Chem. 244, 6395-6402 (1969)

Moellering, H., Bergmeyer, H.U.: Adenosin. In: Methoden der enzymatischen Analyse Bd. 2 (H.U. Bergmeyer, ed.), 2. Auflage, pp. 1853-1856. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1970

Nash, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. Biochem. J. 55, 416-421 (1953)

Olsson, R.A., Davis, C.J., Khouri, E.M., Patterson, R.E.: Evidence for an adenosine receptor on the surface of dog coronary myocytes. Circ. Res. 39, 93-98 (1976)

Pereira, J.N., Holland, G.F.: The effect of nicotinamide adenine dinucleotide on lipolysis in adipose tissue in vitro. Experientia 22, 658-659 (1966)

Perkins, J.P.: Adenyl cyclase. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (P. Greengard, G.A. Robison, eds.) Vol. 3, pp. 1-64. New York: Raven Press 1973

Phillis, J.W.: The role of cyclic nucleotides in the CNS. Can. J. Neurol. Sci. 4, 151-195 (1977)

Premont, J., Perez, M., Bockaert, J.: Adenosine-sensitive adenylate cyclase in rat striatal homogenates. FEBS Lett. 75, 209-212 (1977)

Prilop, B.: Untersuchungen zur Hemmbarkeit des durch Adenosindesaminase an isolierten Adipocyten ausgelösten Anstiegs von cyclischem Adenosin-3',5'-Monophosphat und der Lipolyse durch Prostaglandin E_1 und N^6-Phenylisopropyladenosin. Dissertation, Medizinische Hochschule Hannover (1976)

Raben, M.S., Matsuzaki, F.: Effect of purines on epinephrine-induced lipolysis in adipose tissue. J. Biol. Chem. 241, 4781-4786 (1966)

Robison, G.A., Butcher, R.W., Sutherland, E.W.: Cyclic AMP. New York and London: Academic Press 1971

Rodbell, M.: Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. J. Biol. Chem. 239, 375-380 (1964)

Rodbell, M.: Metabolism of isolated fat cells. V. Preparation of "ghosts" and their properties: adenyl cyclase and other enzymes. J. Biol. Chem. 242, 5744-5750 (1967)

Rodbell, M.: On the mechanism of activation of fat cell adenylate cyclase by guanine nucleotides. J. Biol. Chem. 250, 5826-5834 (1975)

Rodbell, M., Londos, C.: Regulation of hepatic adenylate cyclase by glucagon, GTP, divalent cations, and adenosine. Metabolism 25, 1347-1349 (1976)

Rodbell, M., Lin, M.C., Salomon, Y., Londos, C., Harwood, J.P., Martin, B.R., Rendell, M., Berman, M.: Role of adenine and guanine nucleotides in the activity and response of adenylate cyclase systems to hormones: evidence for multisite transition states. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (G.I. Drummond, P. Greengard, G.A. Robison, eds.) Vol. 5, pp. 3-29. New York: Raven Press 1975

Sachs, L.: Statistische Auswertungsmethoden. 2. Auflage. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag 1969

Sahyoun, N., Schmitges, C.J., Siegel, M.I., Cuatrecasas, P.: Inhibition of fat cell membrane adenylate cyclase by 2'-deoxyadenosine-3'-monophosphate. Life Sc. 19, 1971-1980 (1976)

Sattin, A., Rall, T.W.: The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3',5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. Mol. Pharmacol. 6, 13-23 (1970)

Schillinger, E., Loge, O.: Metabolic effects of N^6-substituted adenosines in rats. Biochem. Pharmacol. 23, 2283-2289 (1974)

Schrader, J., Nees, S., Gerlach, E.: Evidence for a cell surface adenosine receptor on coronary myocytes and atrial muscle cells. Pflügers Arch. 369, 251-257 (1977)

Schwabe, U., Ebert, R.: Different effects of lipolytic hormones and phosphodiesterase inhibitors on cyclic 3',5'-AMP levels in isolated fat cells. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, 287-298 (1972)

Schwabe, U., Ebert, R.: Stimulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation and lipolysis in fat cells by adenosine deaminase. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 282, 33-44 (1974)

Schwabe, U., Ebert, R., Erbler, H.C.: Adenosine release from isolated fat cells and its significance for the effects of hormones on cyclic 3',5'-AMP levels and lipolysis. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276, 133-148 (1973)

Schwabe, U., Ebert, R., Erbler, H.C.: Adenosine release from fat cells: effect on cyclic AMP levels and hormone actions. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (G.I. Drummond, P. Greengard, G.A. Robison, eds.) Vol. 5, pp. 569-584. New York: Raven Press 1975

Schwabe, U., Ebert, R., Schönhöfer, P.S.: Sensitive determination for adenylate cyclase activity by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate protein binding assay. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 286, 83-96 (1974)

Schwartz, A.L., Stern, R.C., Polmar, S.H.: Demonstration of an adenosine receptor on human lymphocytes in vitro and its possible role in the adenosine deaminase-deficient form of severe combined immunodeficiency. Clin. Immunol. Immunopathol. 9, 499-505 (1978)

Simon, L.N., Shuman, D.A., Robins, R.K.: The chemistry and biological properties of nucleotides related to nucleoside 3',5'-cyclic phosphates. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (P. Greengard, G.A. Robison, eds.) Vol. 3, pp. 225-353. New York: Raven Press 1973

Steinberg, D.: Interconvertible enzymes in adipose tissue regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (P. Greengard, G.A. Robison, eds.) Vol. 7, pp. 157-198. New York: Raven Press 1976

Stock, K.: Einfluß von Stimulierung und Blockierung sympathischer Rezeptoren auf Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel. In: Kardiale Sympathikolyse als therapeutisches Prinzip (H. Lydtin, W. Meesmann, eds.) pp. 23-31. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1975

Stock, K., Prilop, M.: Dissociation of catecholamine-induced formation of adenosine 3',5'-monophosphate and release of glycerol in fat cells by prostaglandin E_1, E_2 and N^6-phenylisopropyladenosine. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 282, 15-31 (1974)

Sutherland, E.W., Rall, T.W.: Properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, adenosinetriphosphate, Mg^{2+}, and adrenaline or glucagon. J. Amer. Chem. Soc. 79, 3608 (1957)

Sutherland, E.W., Rall, T.W.: Fractionation and characterisation of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. J. Biol. Chem. 232, 1077-1091 (1958)

Sutherland, E.W., Øye, I., Butcher, R.W.: The action of epinephrine and the role of the adenylcyclase system in hormone action. Recent Prog. Horm. Res. 21, 623-646 (1965)

Swillens, S., Dumont, J.E.: cAMP-protein kinase interaction. In: Cyclic 3',5'-Nucleotides: Mechanisms of Action (H. Cramer, J. Schultz, eds.) pp. 57-63. London - New York - Sydney - Toronto: John Wiley + Sons 1977

Terrine, C., Sadorge, P., Gawer, M., Guern, J.: Etude de la degradation par voie enzymatique des analogues N6-substitues de l'adenosine. Physiol. Veg. 7, 425-435 (1969)

Trost, T.: Further studies on adenosine (AD) derivatives substituted in various positions. Effects on cAMP-accumulation and lipolysis in rat adipocytes and on adenylate cyclase activation in adipocyte plasma membranes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 297, (Suppl. 2), R 13 (1977)

Trost, T., Stock, K.: Effects of N^6-substituted adenosine derivatives on noradrenaline (NA)-induced lipolysis and cAMP formation in rat adipocytes, and on NA-stimulated adenylate cyclase in adipocyte plasma membranes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, (Suppl.), R 31 (1976)

Trost, T., Stock, K.: Effects of adenosine derivatives on cAMP accumulation and lipolysis in rat adipocytes and on adenylate cyclase in adipocyte plasma membranes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 299, 33-40 (1977)

Trost, T., Stock, K.: Different action of adenosine on cAMP formation and lipolysis in fat cells and on adenylate cyclase of fat cell plasma membranes. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research (W.J. George, L.J. Ignarro, eds.) Vol. 9, p. 771. New York: Raven Press 1978

Trost, T., Stock, K.: Adenosine effects in adipose tissue: role of adenosine on the cyclic AMP system and lipolysis of fat cells. In: Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adenine Nucleotides (H.P. Baer, G.I. Drummond, eds.). New York: Raven Press 1979 (in press)

Westermann, E.: Mechanismus und pharmakologische Beeinflussung der endokrinen Lipolyse. In: 12. Symposium der Deutschen Ges. f. Endokrinologie. pp. 154-173. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1967

Westermann, E., Stock, K.: Inhibitors of lipolysis: potency and mode of action of α- and ß-adrenolytics, methoxamine derivatives, prostaglandin E_1 and phenylisopropyladenosine. In: Adipose Tissue. Regulation and Metabolic Functions (B. Jeanrenaud and D. Hepp, eds.) pp. 47-54. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1970

Westermann, E., Stock, K., Bieck, P.: Phenylisopropyl-Adenosin (PIA): Ein potenter Hemmstoff der Lipolyse in vitro und in vivo. In: Fettstoffwechsel (L. Demling, G. Berg, eds.) Vol. 5, pp. 68-73. Lochham/München: Pallas Verlag 1969

Wiedbrauck, T.: Simultaneous measurement of cAMP-dependent proteinkinase activation, cAMP accumulation and lipolysis in intact adipocytes in the presence and absence of various activators and inhibitors. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 297 (Suppl. 2), R 13 (1977)

Williams, L.T., Jarett, L., Lefkowitz, R.J.: Adipocyte ß-adrenergic receptors. J. Biol. Chem. 251, 3096-3104 (1976)

Wolff, J., Cook, G.H.: Activation of steroidogenesis and adenylate cyclase by adenosine in adrenal and leydig tumor cells. J. Biol. Chem. 252, 687-693 (1977)

Yamamura, H., Lad, P.M., Rodbell, M.: GTP stimulates and inhibits adenylate cyclase in fat cell membranes through distinct regulatory processes. J. Biol. Chem. 252, 7964-7966 (1977)

LEBENSLAUF

Am 6. Januar 1947 wurde ich als zweiter Sohn des Kaufmanns Ferdinand Trost und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Seydel, in Heiligenstadt/Eichsfeld geboren. Im Jahre 1949 verließen meine Eltern Heiligenstadt und wurden durch das Flüchtlingslager Uelzen nach Varel in Oldenburg eingewiesen.

Von Ostern 1953 bis Ostern 1957 besuchte ich die Knabenschule Varel. Am 25. April 1957 wechselte ich in das Gymnasium Varel über. Im April 1961 verzogen meine Eltern nach Baiersbronn/Kreis Freudenstadt. Meine Schulausbildung setzte ich am Kepler-Gymnasium in Freudenstadt fort und legte am 7. Juni 1967 die Reifeprüfung ab. Vom 2. Oktober 1967 bis zum 31. März 1969 absolvierte ich meinen Wehrdienst bei der Bundesmarine. Im Sommersemester 1969 belegte ich das Fach Agrarbiologie an der Universität Hohenheim. Vom 1. Oktober 1969 bis zum 30. September 1971 war ich als Apothekerpraktikant in der See-Apotheke, Apotheker W. Götz, in Konstanz tätig. Am 23. September 1971 legte ich in Freiburg/Breisgau die Pharmazeutische Vorprüfung ab. Im Wintersemester 1971 begann ich mit dem Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Den ersten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung bestand ich am 3. Oktober 1973, den zweiten Abschnitt am 11. März 1975. Am 25. April 1975 wurde mir die Approbation als Apotheker erteilt.

Am 1. Mai 1975 begann ich unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Klaus Stock in der Abteilung Molekularpharmakologie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover mit den Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation. Vom 1. Mai 1975 bis zum 31. Mai 1975 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft, vom 1. Juni 1975 bis zum 10. September 1975 als Verwalter der Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten und vom 11. September 1975 bis zum 30. Juni 1978 als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover tätig.

Seit dem 28. Mai 1976 bin ich mit Apothekerin Elke Trost, geb. Winkler, verheiratet.

Meine akademischen Lehrer waren an der Universität Tübingen die Herren Professoren H.P.T. Ammon (Pharmakologie), H. Auterhoff (Pharmazeutische Chemie), R.E. Bader (Hygiene und Medizinische Mikrobiologie), E. Graf (Pharmazeutische Technologie), K.-A. Kovar (Pharmazeutische Chemie), F. Moll (Pharmazeutische Chemie), E. Müller (Organische Chemie), E. Reinhard (Pharmazeutische Biologie), W. Rüdorff (Anorganische Chemie) und H. Seiler (Physik) und an der Medizinischen Hochschule Hannover die Herren Professoren F. Heinz (Biochemie), W. Lamprecht (Biochemie), P.S. Schönhöfer (Pharmakologie), H. Scholz (Biochemische Pharmakologie), U. Schwabe (Pharmakologie), K. Stock (Molekularpharmakologie), H.H. Wellhöner (Toxikologie) und E. Westermann (Pharmakologie).

Offsetdruck Bütiger
Dissertationen & Reprints
Göttinger Chaussee 109
3000 Hannover 91
Tel. (0511) 41 28 28